



Chemin des Capelles  
31076 Toulouse Cedex

Place Eugène Bataillon  
34095 Montpellier Cedex 5

Formation en Elevage et  
Médecine Vétérinaire  
Tropicale

Campus de Baillarguet ; TA  
A-15 / B

34 398 Montpellier Cedex 5

## **MASTER 2<sup>nd</sup>e ANNEE**

### **MENTION SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT - BGAE**

#### **SPECIALITE BIODIVERSITE DES INTERACTIONS MICROBIENNES ET PARASITAIRES**

#### **PARCOURS SAEPS**

---

#### **SANTE ANIMALE ET EPIDEMIOSURVEILLANCE**

#### **DANS LES PAYS DU SUD**

---

## **RAPPORT DE STAGE**

# **CINETIQUES DES POPULATIONS DE PARASITES ET DES REPONSES DE L'HÔTE AU COURS D'UNE PRIMO-INFESTATION PAR *HAEMONCHUS CONTORTUS* :**

*COMPARAISON DES RACES LACAUNE ET MARTINIK BLACK BELLY*

---

Présenté par

**Mohamed BENGUESMIA**

Réalisé sous la direction de : Pr. JACQUIET Philippe

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse

Organisme et pays : UMR INRA/ENV 1225 Interactions Hôtes Agents pathogènes, ENV Toulouse, France.

Période du stage : du 17 Mai au 15 Septembre 2010

Date de soutenance : 16 et 17 Septembre 2010



Année universitaire 2009-2010



Master 2<sup>nd</sup>e année

MENTION SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT - BGAE

SPECIALITE BIODIVERSITE DES INTERACTIONS MICROBIENNES ET PARASITAIRES

PARCOURS SAEPS

---

SANTE ANIMALE ET EPIDEMIOSURVEILLANCE

DANS LES PAYS DU SUD

---

## RAPPORT DE STAGE

# **CINETIQUES DES POPULATIONS DE PARASITES ET DES REPONSES DE L'HÔTE AU COURS D'UNE PRIMO-INFESTATION PAR *HAEMONCHUS CONTORTUS* :**

*COMPARAISON DES RACES LACAUNE ET MARTINIK BLACK BELLY*

---

Présenté par

**Mohamed BENGUESMIA**

Réalisé sous la direction de : Pr. JACQUIET Philippe

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse

Organisme et pays : UMR INRA/ENV 1225 Interactions Hôtes Agents pathogènes, ENV Toulouse, France.

Période du stage : du 17 Mai au 15 Septembre 2010

Date de soutenance : 16 et 17 Septembre 2010

Année universitaire 2009-2010

# REMERCIEMENTS

*Nous tenons à remercier très vivement notre promoteur Pr. JACQUIET Philippe. Professeur en Parasitologie et Maladies parasitaires (ENVToulouse) pour nous avoir inspiré ce sujet, pour avoir corrigé ce travail, pour l'aide immense qu'il nous a apporté et pour ses qualités professionnelles.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à Dr. LIENARD Emmanuel, Maître de Conférences en Parasitologie et Maladies parasitaires (ENVToulouse) pour avoir accepté de corriger ce travail ainsi que pour ses précieux conseils.*

*Nos remerciements vont également à l'égard du Dr. LACROUX Caroline du Service d'Anatomie Pathologique de l'ENVT pour la réalisation des lames en histologie.*

*Nous remercions aussi Dr. TRUMEL Cathy et Dr. GEFFRE Anne du Service de Biologie Clinique de l'ENVT pour les analyses hématologiques.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à l'assesseur de notre Rapport Dr. THEVENON Sophie qui nous fait l'honneur de juger notre travail.*

*Nos hommages vont au Professeur MILON Alain, Directeur de l'ENVToulouse, qui a tout mis à notre disposition pour la réalisation de ce rapport.*

*Nos remerciements vont aussi à GRISSEZ C., PREVOT F., BERGEAUD J.P. et CHRETIEN A., qui nous ont fourni tous les soutiens nécessaires avec beaucoup de bonne volonté.*

*Nous remercions tout le personnel de l'Ecole, en particulier celui de la bibliothèque et de bureau des relations internationales.*

# Abréviations/Symboles

**AHs** : Anthelminthiques

**Bv** : Bovin

**D** : densité

**EDTA**: Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique

**G** : Gramme

**HCL** : Acide Chlorhydrique

**Ig** : Immunoglobuline

**J** : Jour.

**Kg** : Kilogramme

**L** : Larve.

**M** : Molaire

**mA** : million Ampère

**M.G.G** : May-Grünwald Giemsa

**mm** : millimètre

**µm** : micromètre

**µg**: microgramme

**µl**: microlitre

**mL** : millilitre

**mn** : minute.

**nm**: nano mètre

**OPG**: Oeufs par gramme de Matières fécales

**Ov**: Ovin

**PVDF**: polyvinylidene fluoride

**RT-PCR**: Real Time - Polymerase Chain Reaction

**SC** : Sous Cutanée

**VO** : Voie Orale

**®** : Marque déposée

---

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## **Etude bibliographique**

1. Importance des strongles gastro – intestinaux en élevage ovin en France.....	4
2. <i>Haemonchus contortus</i> et haemonchose ovine .....	4
2.1. Systématique et caractères morphologiques.....	4
2.1.1. Systématique, animaux touchés et distribution géographique.....	4
2.1.2. Caractères morphologiques d' <i>H.contortus</i> .....	5
2.2. Cycle biologique.....	7
2.3. Haemonchose à <i>H. contortus</i> .....	8
2.3.1. Symptômes.....	8
2.3.2. Lésions.....	9
2.3.3. Diagnostic.....	9
2.3.4. La réponse immunitaire des ovins lors d'infestation par des strongles gastro-intestinaux.....	10
2.4. Moyens et méthodes de lutte.....	14
2.4.1. Les principales anthelminthiques utilisés.....	14
2.4.2. Tarissement des sources de contamination.....	14
2.4.3. Augmentation de la résistance de l'hôte.....	15

## **Etude expérimentale**

Introduction.....	18
2. Objectifs .....	18
3. Matériels et méthodes.....	18
2.1. Matériels.....	18
2.1.1. Les ovins .....	18
2.1.1.1. Ovins de race Martinik Black Belly.....	18
2.1.1.2. Ovins de race Lacaune.....	19
2.1.1.3. Age, sexe et entretien des animaux.....	19
2.1.2. Les parasites.....	20
2.2. Méthodes.....	20

2.2.1. Dispositif expérimental.....	20
2.2.2. Ante mortem.....	22
2.2.2.1. Examen coproscopique quantitatif (OPG).....	22
2.2.2.2. Mesure de l'hématocrite.....	23
2.2.2.3. Mesure du nombre total d'hématies, de l'hémoglobine, du taux de réticulocytes et du nombre total d'hématies et de l'éosinophilie sanguine .....	23
2.2.2.4. Dosage du pepsinogène sanguin.....	23
2.2.3. Post mortem.....	23
2.2.3.1. Etude quantitative et qualitative des populations parasitaires ....	23
2.2.3.2. Infiltration cellulaire de la muqueuse abomasale (éosinophiles)...	24
2.2.3.3. Mise en évidence de la protéine Gal-15 dans le mucus .....	25
3. Résultats.....	26
3.2.1. Ante mortem.....	26
3.2.1.1. Comptage des œufs dans les matières fécales .....	26
3.2.1.2. Cinétique des mesures de l'hématocrite.....	26
3.2.1.3. Cinétique du nombre total d'hématies de l'hémoglobine .....	27
3.2.1.4. Cinétique de l'éosinophilie sanguine.....	28
3.2.1.5. Cinétique du taux de réticulocyte.....	29
3.2.1.6. Dosage du pepsinogène sanguin.....	29
3.2.2. Post mortem.....	30
3.2.2.1. Etude quantitative et qualitative des populations parasitaires .....	30
3.2.2.2. Infiltration cellulaire de la muqueuse abomasale (éosinophiles).....	32
3.2.2.3. Cinétique de la présence de la protéine Gal-15 dans le mucus .....	34
4. Discussion.....	36
4.1. Protocole expérimental et méthodes utilisées.....	36
4.2. Résultats.....	36
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>40</b>

## Références bibliographiques

## Annexes

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Haemonchinae des ruminants domestiques, hôtes et répartitions géographiques.....	5
<b>Tableau 2.</b> Liste de certains médicaments recommandés contre l'haemonchose chez les ovins..	14
<b>Tableau 3.</b> Agneaux de race Black Belly.....	20
<b>Tableau 4.</b> Agneaux de race Lacaune.....	20
<b>Tableau 5.</b> Longueurs moyennes des femelles adultes à J <sub>21</sub> et J <sub>30</sub> : comparaison entre les deux races...	32

---



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Clés d'identification d' <i>Haemonchus contortus</i> .....	6
<b>Figure 2.</b> Cycle évolutif d' <i>Haemonchus contortus</i> .....	8
<b>Figure 3.</b> Organisation générale de la réponse immunitaire adaptative.....	13
<b>Figure 4.</b> Le protocole expérimental.....	21
<b>Figure 5.</b> Méthode de Mac Master modifiée par Raynaud.....	22
<b>Figure 6.</b> Intensités d'excrétion d'œufs (indiquée en œufs par gramme de matières fécales ou OPG) au cours d'une primo-infestation par <i>Haemonchus contortus</i> .....	26
<b>Figure 7.</b> Cinétique de l'hématocrite chez les Lacaune et les Black Belly.....	27
<b>Figure 8.</b> Cinétique du nombre total d'hématies par mm <sup>3</sup> chez les Lacaune et les Black Belly...	27
<b>Figure 9.</b> Cinétique de l'hémoglobininémie chez les Lacaune et les Black Belly.....	28
<b>Figure 10.</b> Cinétique de l'éosinophilie sanguine chez les Lacaune et les Black Belly.....	28
<b>Figure 11.</b> Cinétique du taux de réticulocytes chez les Lacaune et les Black Belly.....	29
<b>Figure 12.</b> Dosage du pepsinogène chez les Lacaune et les Black Belly.....	29
<b>Figure 13.</b> Nombre total de vers retrouvés à l'autopsie par animal.....	30
<b>Figure 14.</b> Proportions des différents stades du parasite au cours d'une primo-infestation.....	31
<b>Figure 15.</b> Nombre moyen des éosinophiles dans la région du Fundus.....	33
<b>Figure 16.</b> Nombre moyen des éosinophiles dans la région Intermédiaire.....	33
<b>Figure 17.</b> Nombre moyen des éosinophiles dans la région du Pylore.....	33
<b>Figure 18.</b> Absence de la protéine Gal-15 dans le mucus d'animaux non infestés (J <sub>0</sub> ).....	35
<b>Figure 19.</b> Présence de la protéine Gal-15 dans le mucus d'animaux infestés et abattus à J <sub>8</sub> .....	35

---

## LISTE DES PHOTOS

<b>Photo 1.</b> Signe de la bouteille chez un agneau infesté par l'haemonchose.....	9
<b>Photo 2.</b> Vers d' <i>Haemonchus contortus</i> collés à la base des plis de la caillette.....	9
<b>Photo 3.</b> Brebis de race Black Belly.....	19
<b>Photo 4.</b> Brebis de race Lacaune.....	19

---

# Introduction

# Introduction

Les infestations par les nématodes gastro-intestinaux comme *Haemonchus contortus* sont à l'origine de grandes pertes économiques en élevage des petits ruminants en raison des retards de croissance, des pertes de poids, des troubles de la fertilité, des diminutions de la production laitière et des mortalités des jeunes animaux qu'elles génèrent. Récemment, les problèmes posés par ce nématode se sont encore accentués avec l'apparition chez certaines populations d'*H. contortus* d'une résistance à une ou plusieurs classes d'anthelminthiques utilisés couramment : benzimidazoles (BZ), imidazothiazoles ou lactones macrocycliques (LM).

Afin de retarder l'apparition de la résistance, il est urgent de développer des méthodes alternatives à l'emploi de ces molécules de synthèse. L'utilisation d'animaux ou de races génétiquement résistants à ce nématode en fait partie. Des différences de résistance à *H. contortus* entre races ovines ont été rapportées à maintes reprises (voir la revue Bishop et Morris, 2007). Les mécanismes qui sous tendent ces différences ne sont pas bien connus. Terefe et *al.* (2007b) ont montré que les animaux de race Martinik Black Belly (MBB) présentent une plus grande résistance à *H. contortus* dès la primo-infestation en comparaison avec des animaux de race sensible. Ceci suggère une éventuelle participation de la réponse immunitaire innée dans les processus de régulation précoce des infestations par *H. contortus* chez les MBB. Une étude menée en 2008/2009 a utilisé une technique de Microarray avec une puce spécifique ovine de 15 000 gènes pour comparer l'expression de gènes entre animaux de race résistante (MBB) et animaux de race sensible en tout début de primo-infestation (J<sub>8</sub>). Ceci a permis de mettre en évidence une liste restreinte de gènes très différemment exprimés entre ces deux groupes d'animaux (données non publiées). Parmi ces gènes, figure le gène d'une lectine, la galectine 15 (ovGal 15), spécifique des ovins, qui est sécrétée par les cellules épithéliales de la muqueuse digestive lors d'infestation par des helminthes (Dunphy et *al.*, 2000). Les résultats de RNA microarrays ont ensuite été confirmés en RT-PCR quantitative. Toutefois, ils ne concernent qu'un moment particulier de la primo-infestation (8 jours post inoculation) et la démonstration de la présence de la protéine dans le mucus de ces animaux n'a pas encore été faite.

C'est pourquoi, une étude expérimentale a été effectuée pour évaluer la cinétique comparée de la présence de cette lectine (ovGal-15) dans le mucus de la caillette d'animaux résistants (MBB)

ou sensibles (Lacaune) durant les trente premiers jours d'une primo-infestation. Des évaluations des populations parasites et des analyses de physiopathologie sont venues compléter ces données.

Avant d'exposer nos résultats et de les commenter, il est important de faire un rappel de l'importance des strongles gastro-intestinaux pour l'élevage ovin en France, de la taxonomie, la morphologie et la biologie du parasite *Haemonchus contortus*, l'épidémiologie, la distribution géographique, la pathologie, le diagnostic de l'haemonchose ainsi que des moyens de lutte appliqués à l'encontre de cette affection parasitaire redoutable.

# Etude bibliographique

## 1. Importance des strongles gastro-intestinaux en élevage ovin en France

Actuellement, le cheptel ovin français est composé d'environ 7,5 millions d'animaux, dont 5 millions de brebis. Le sud de la France reste la première zone d'élevage ovin (Midi-Pyrénées, Poitou-Charentes, Limousin, Aquitaine, Provence-Alpes-Côte d'Azur et Auvergne) (AGRESTE, 2010). Une large part des dépenses en élevage conventionnel (7 à 12%) est attribuable aux pathologies ovines et à leur contrôle (Cabaret, 2004). Le contrôle du parasitisme helminthique et des nématodes en particulier est considéré comme un élément essentiel de la gestion de la santé d'un troupeau de ruminants. Au sein des nématodoses, les strongyloses gastro-intestinales ovines et notamment l'haemonchose sont des parasitoses majeures des ovins. L'haemonchose est due à un strongle hématophage de la caillette, *Haemonchus contortus*, qui provoque des pertes économiques importantes (mortalité des jeunes, chutes de fertilité et de prolificité...), dont la répartition géographique irrégulière en régions tempérées serait influencée par les conditions climatiques ou par des phénomènes plus aléatoires relatifs aux conduites d'élevage (introduction à un moment adéquat au sein d'un troupeau). De plus, *Haemonchus contortus* représente l'espèce majeure dans toutes les régions tropicales (Lacroux, 2006).

## 2. *Haemonchus contortus* et l'haemonchose ovine

### 2.1. Systématique et caractères morphologiques

#### 2.1.1. Systématique, animaux infestés et distribution géographique

D'après Durette-Desset et Chabaud (1993), l'espèce *Haemonchus contortus*, appartient à :

**Phylum.** Némathelminthes

**Classe.** Nématodes

**Sous-Classe.** Secernentea

**Ordre.** Strongylida

**Sous-Ordre.** Trichostrongylina

**Super-Famille.** Trichostrongyloidea

**Famille.** Trichostrongylidae

**Sous-Famille.** Haemonchinae

**Genre.** *Haemonchus*

Quatre espèces du genre *Haemonchus* sont reconnues chez les ruminants domestiques (Tableau 1).

**Tableau 1.** Haemonchinae des ruminants domestiques, hôtes et répartitions géographiques (Chartier et *al.*, 2000)

Espèce	Hôtes	Aires de distribution
<i>Haemonchus contortus</i> (Rudolphi, 1803)	ovins caprins	Cosmopolite
<i>Haemonchus similis</i> (Travassos, 1914)	bovins	Afrique centrale et de l'Est Antilles
<i>Haemonchus placei</i> (Place, 1893)	bovins	Régions tropicales
<i>Haemonchus longistipes</i> (Raillet et Henry, 1909)	dromadaires	Afrique et Asie

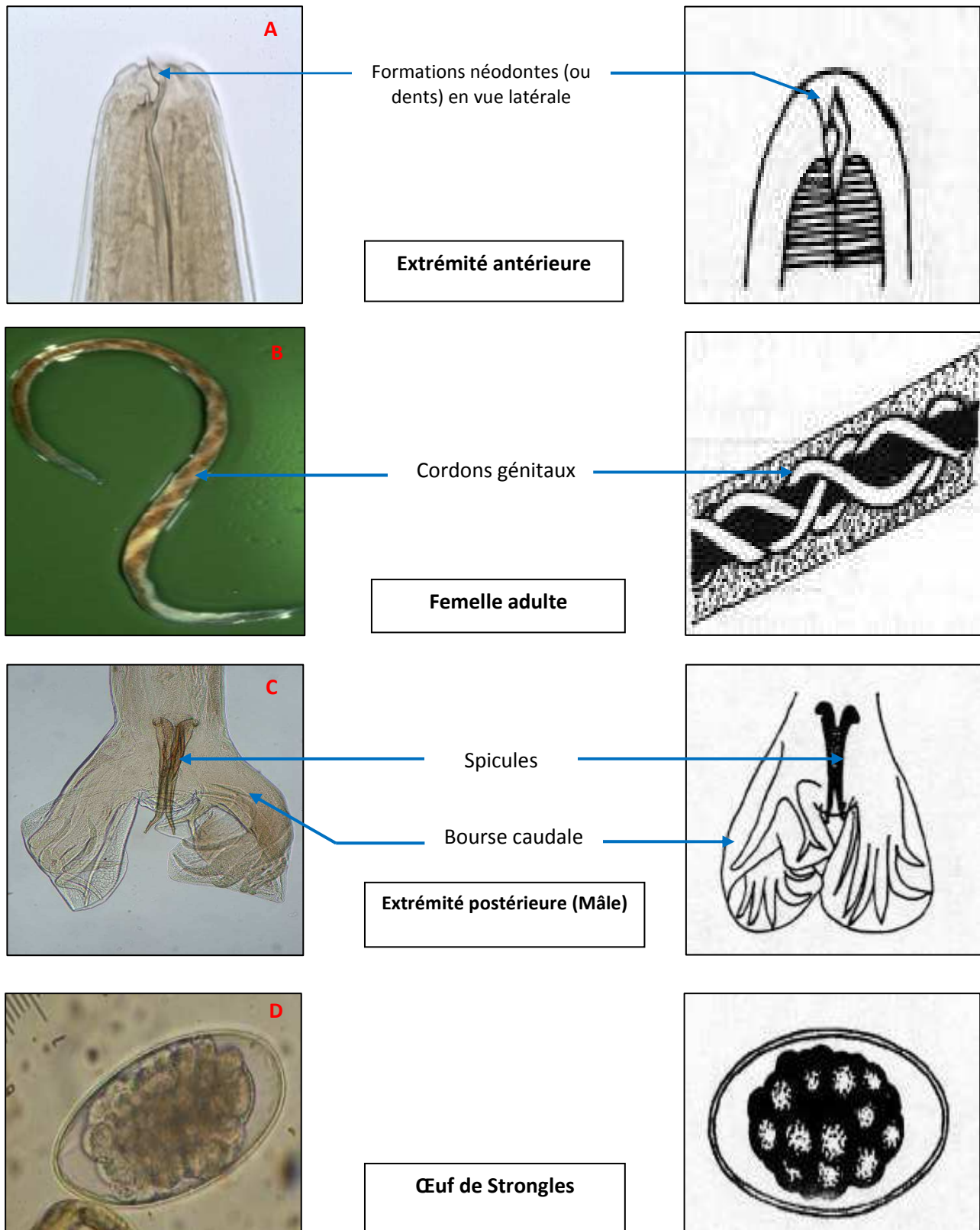
### 2.1.2. Caractères morphologiques d'*H. contortus* (Figure 1)

Au stade adulte, *Haemonchus contortus* est un nématode de 15 à 35 mm de long sur 0,4 à 0,6 mm de large, facilement identifiable par sa localisation spécifique dans la caillette des ovins et caprins et par sa coloration brun-rosée uniforme due à l'hématophagie. Son extrémité antérieure possède des papilles céphaliques bien développées et est constituée d'une ébauche de capsule buccale conique renfermant une petite lancette. Cette lancette est en fait une dent vestigiale perforante dont les parasites se dotent juste avant leur dernière mue, elle leur permet d'atteindre la lumière des capillaires sanguins de la muqueuse.

- La femelle : ses deux cordons génitaux blancs spiralés s'enroulent autour du tube digestif rougeâtre (« vers mirliton »). La vulve, localisée aux trois quarts de la longueur du corps, est souvent surmontée d'une languette supra-vulvaire ;
- Le mâle : plus petit que la femelle, sa bourse copulatrice est formée de deux grands lobes latéraux et d'un petit lobe dorsal asymétrique bardé de deux spicules (0,5 mm) et soutenu par une côte en Y inversé ;

Les œufs sont de type strongle (Longueur : 80-100 µm, largeur : 40-50 µm) avec une coque mince ovalaire, contenant une morula grisâtre qui ne remplit pas la totalité de la coque (Bussi  ras et Chermette, 1991 ; Bowman, 1999).





**Figure 1.** Clés d'identification d'*Haemonchus contortus* (Bussi ras et Chermette, 1991 et 1995)

**A :** [www.univ-reims.fr](http://www.univ-reims.fr) , **B :** <http://www.jeannoon.com/garlicforparasites.html>

**C et D:** [http://edoc.ub.uni-muenchen.de/10577/1/Scheuerle\\_Miriam\\_C.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/10577/1/Scheuerle_Miriam_C.pdf)

### 2.1.3. Cycle évolutif

*Haemonchus contortus* a un cycle évolutif monoxène (un seul hôte) qui comprend deux phases : une phase libre dans les pâturages (phase exogène) et une phase parasitaire dans la caillette de l'hôte (phase endogène) (Figure 2).

Le stade libre du cycle commence au moment où les œufs sont éliminés avec les matières fécales d'un animal infesté. Ces œufs éclosent en larves de premier stade ( $L_1$ ), qui muent en deuxième stade larvaire ( $L_2$ ) en perdant leur cuticule protectrice. La larve  $L_2$  se développe en une larve de troisième stade ( $L_3$ ), mais conserve sa cuticule du stade  $L_2$ .

Les deux premiers stades larvaires de type rhabditoïde se nourrissent habituellement de bactéries et de matières organiques, mais les  $L_3$  de type strongyloïde, isolées de l'environnement par la cuticule de  $L_2$ , ne peuvent se nourrir et doivent survivre avec les nutriments acquis et stockés lors des deux premiers stades larvaires. Le temps nécessaire pour que les œufs se transforment en larves infestantes dépend principalement de la température et de l'humidité de l'environnement. Dans des conditions optimales (humidité et température élevées), le processus de développement s'effectue en 7-10 jours tandis que dans des températures plus fraîches le processus peut se prolonger plusieurs semaines.

La phase parasitaire commence par l'ingestion des  $L_3$  infestantes par un hôte lors du pâturage. Dans le rumen, les  $L_3$  d'*H. contortus* se libèrent d'abord de leur gaine. Les  $L_3$  dégainées pénètrent ensuite dans les culs de sacs des glandes de la muqueuse de la caillette, principalement dans la région fundique où elles muent en larves 4 ( $L_4$ ). A ce stade, il est fréquent que les larves s'enkystent dans la muqueuse digestive et retardent leur développement (phénomène d'« hypobiose larvaire », ou de « développement retardé des larves », observé en hiver, les larves ne reprenant leur développement normal qu'au printemps suivant). Les  $L_4$  muent une dernière fois pour donner le stade 5 (immatures mâles et femelles). Le passage au stade adulte correspond à l'acquisition de la maturité sexuelle. Après fécondation, les femelles pondent des œufs excrétés dans les matières fécales de l'hôte.

La durée comprise entre l'ingestion des larves infestantes et la première ponte des vers femelles est la période prépatente ; en l'absence d'hypobiose au stade  $L_4$ , celle-ci est d'environ 3 semaines (Bowman, 1999 ; Lacroux, 2006 ; Terefe, 2007 ; Brunet, 2008).

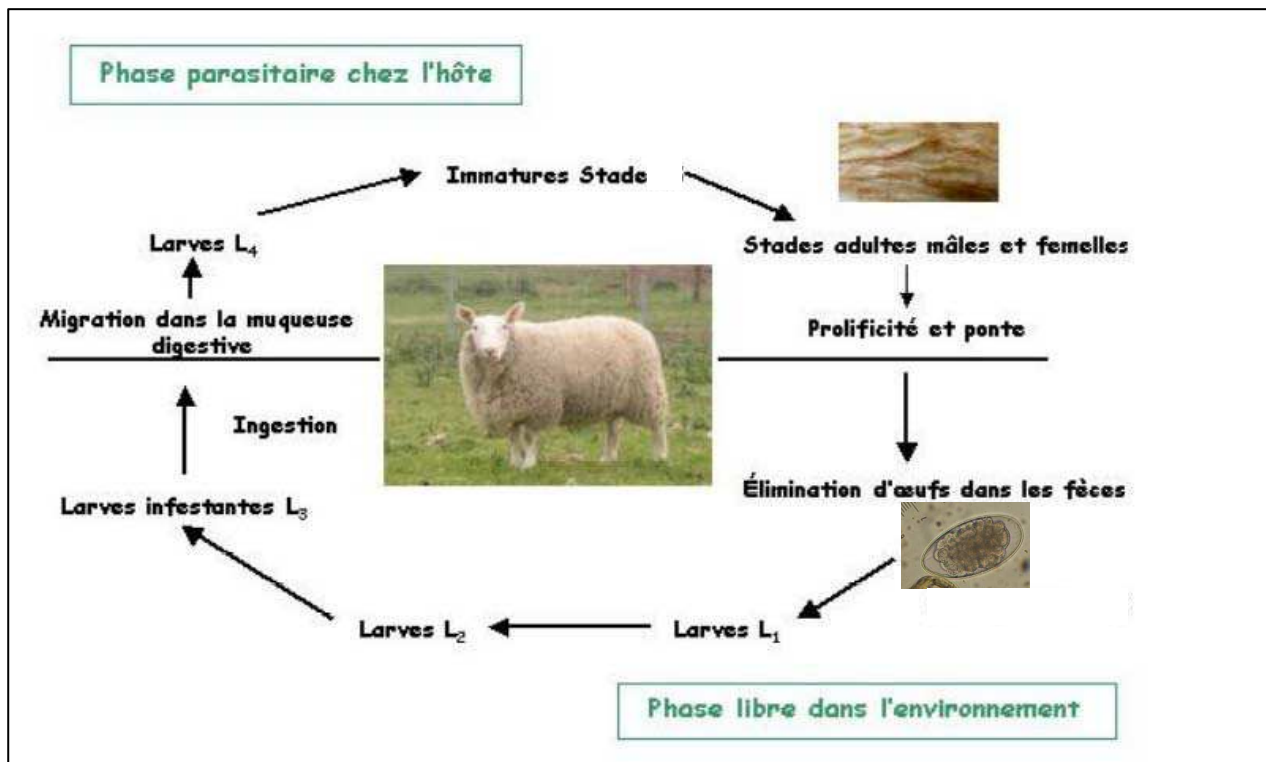


Figure 2. Cycle évolutif d'*Haemonchus contortus* (Autef, 2006)

## 2.5. Haemonchose à *H. contortus*

### 2.5.1. Symptômes

L'haemonchose ovine peut se présenter sous 3 formes :

- **Forme suraiguë**, très rare et n'apparaît que chez les agneaux très sensibles. La mort peut survenir de façon subite avec une gastrite hémorragique sévère dans la semaine suivant une infestation massive (plus de 30 000 vers) (Urquhart et *al.*, 1996 ; Penicaud, 2007).
- **Forme aiguë**, se caractérise par une sévère anémie accompagnée d'un œdème de l'auge (« signe de bouteille ») (Photo1). L'anémie est également caractéristique de la forme chronique, souvent la charge parasitaire est faible et étalée dans le temps (Urquhart et *al.*, 1996).
- **Forme chronique**, la plus fréquente, à l'origine des pertes économiques les plus importantes en raison d'une morbidité élevée. Elle apparaît de façon discrète et insidieuse et aboutit à une dégradation progressive de l'état général (perte de poids et faiblesse) rappelant la malnutrition (Lacroux, 2006).

### 2.5.2. Lésions

- **Carcasse** : cachexie et anémie généralisée.

• **Caillette** : lésions inflammatoires de la paroi telles que congestion, hypersécrétion de mucus, épaissement de la muqueuse et œdème de la sous-muqueuse.

On peut noter la présence de foyers hémorragiques plus ou moins confluents, ainsi que des ulcères, qui correspondent aux points de fixation des vers et aux hémorragies qu'ils provoquent lorsqu'ils se détachent. De petits nodules blanchâtres (1 à 2 mm de diamètre) peuvent traduire la présence de larves enkystées. Si l'autopsie est précoce, il est possible d'observer des vers adultes vivants et très mobiles (Photo 2) (Mage, 1991; Brard et Chartier, 1997).

### 2.5.3. Diagnostic

• **Diagnostic clinique** : difficile, car les symptômes ne sont jamais univoques. Lorsqu'on est en présence de plusieurs sujets présentant une anémie, une diarrhée et un œdème dans la région de l'auge, il faut penser aux strongyloses gastro-intestinales et en particulier à l'haemonchose ;

• **Diagnostic coproscopique** : il consiste en la recherche des œufs dans les selles puis en l'identification des genres après coproculture. Œufs à coque mince, contenant une morula ; 80-100 x 40-50µm, sauf *Nematodirus*, très volumineux (150-250 µm x 70 -120) et à coque plus épaisse. Cependant, ce diagnostic est impossible si la maladie est due à des larves ou si l'on est en période d'hypobiose (Bussi  ras et Chermette, 1991).



**Photo 1.** Signe de la bouteille chez un agneau infest   par l'Haemonchose (Autef, 2006)



**Photo 2.** Vers d'*Haemonchus contortus* sur les plis de la caillette (Photo P. Jacquet)

## 2.6. La réponse immunitaire des ovins lors d'infestation par des strongles gastro-intestinaux

La réponse immunitaire des hôtes face à une infection est classiquement divisée en deux grandes catégories (Janeway, 2001 ; Goldsby et *al.*, 2003 ; Tosi, 2005):

- **La réponse immunitaire innée**, dans laquelle des mécanismes non spécifiques, rapides et des plus anciens sur le plan phylogénétique, sont mis en œuvre contre un pathogène.

L'immunité naturelle n'est pas toujours suffisante pour éliminer le pathogène, mais elle est indispensable pour mener à bien une première défense en attendant que l'immunité adaptative prenne le relais.

- **La réponse immunitaire adaptative**, dans laquelle des réponses plus tardives sont mises en jeu. Cette réponse présente à la fois un haut degré de spécificité envers le pathogène rencontré ainsi qu'une remarquable propriété de « mémoire » : la ré-exposition à un même antigène a pour conséquence une réponse immunitaire plus rapide et souvent plus importante qualitativement (plus grande affinité des anticorps pour l'antigène) et quantitativement (titres en anticorps élevés), pour neutraliser l'agent pathogène en cause (Doenhoff, 2000).

### A. La réponse immunitaire innée

Cette réponse représente la première ligne de défense de l'hôte face à un parasite ou à un agent pathogène en général. Au niveau du tractus gastro-intestinal, cette ligne de défense comprend des mécanismes actifs et passifs. Les barrières passives comprennent les barrières physiques comme l'épithélium digestif, les contractions intestinales et les sécrétions muqueuses (mucines en particulier) qui inhibent le développement de certains pathogènes ou leur attachement à la muqueuse (Béné et Faure, 2000 ; Basset et *al.*, 2003; Sansonetti, 2004).

Ces barrières passives peuvent parfois s'avérer insuffisantes, laissant le champ libre à des pathogènes bientôt confrontés à un deuxième rideau défensif actif. En effet, la présence de pathogènes dans les tissus stimule les mastocytes et plusieurs systèmes protéiques aboutissant à la mise en place d'une réponse inflammatoire. Cette inflammation facilite la diffusion locale d'agents

biochimiques (chémokines par exemple), et le recrutement de macrophages qui phagocytent (endocytose suivie de la dégranulation de substances oxydatives) le pathogène. Les cellules épithéliales participent également à cette deuxième ligne de défense en produisant et sécrétant un certain nombre de facteurs solubles comme les lectines. Les « lectines » sont une grande famille de glycoprotéines capables de se fixer sur des résidus sucrés, très conservées au cours de l'évolution et qui ont de nombreuses fonctions biologiques comme la régulation de la prolifération cellulaire ou bien la reconnaissance innée de déterminants glucidiques à la surface d'agents pathogènes. Certaines lectines, comme les intélectines, semblent associées à l'expulsion de nématodes gastro-intestinaux chez la souris (Artis, 2006). En effet, elles formeraient un ciment glycoprotéique à la surface du nématode provoquant ainsi une perte de fitness voire son expulsion prématurée du tube digestif de l'hôte. Chez le mouton, une lectine spécifique, la galectine 15 (ovGal-15) a été récemment décrite (Dunphy et *al.*, 2000) dans la muqueuse de la caillette. Elle est sécrétée par les cellules épithéliales en réponse à l'agression par *H. contortus* et se fixerait sur les résidus  $\beta$ -galactose de l'épicuticule des larves de ce nématode. Son rôle exact n'est pas connu mais elle pourrait former une barrière physique contre les stades invasifs ou en développement du parasite et participer à la reconnaissance immune initiale de celui-ci (de Veer et *al.*, 2007 ; Vasta, 2009). Enfin, il faut noter que l'expression du gène de Gal-15 n'a été retrouvée que dans des muqueuses présentant une forte infiltration par des éosinophiles (Dunphy et *al.*, 2000). Les raisons de cette association éosinophiles-galectine-15 ne sont pas connues.

### **A. La réponse immunitaire adaptative (Figure 3)**

L'immunité adaptative est basée sur la reconnaissance d'antigènes du « non-soi » durant le processus de présentation d'antigènes. Cette présentation d'antigènes est une interaction entre trois effecteurs majeurs de la réponse spécifique : les lymphocytes T (devenus matures dans le thymus), les lymphocytes B (devenus matures dans la moelle osseuse) et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques ou les macrophages. Grâce aux immunoglobulines (Ig) situées à leur surface, les lymphocytes B peuvent reconnaître directement l'antigène brut. Au contraire, les lymphocytes T, exprimant des récepteurs spécifiques (TcR), ne reconnaissent que les antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des CPA, chaque molécule du CMH étant spécifique d'un antigène donné. Durant la réponse immunitaire innée, certains antigènes vont être pris en charge et présentés par les macrophages aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (aussi appelés lymphocytes T helper) dans la rate ou les nœuds lymphatiques.

Cette présentation conduit à la spécialisation de ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en Th1 ou Th2 selon le type de pathogène. La réponse Th1 est caractérisée par la production d'interféron  $\gamma$ , et aboutit à une immunité à médiation cellulaire : activation des macrophages, activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (lymphocytes T cytotoxiques) et production d'Ig opsonisants par les lymphocytes B. Cette opsonisation facilitera par la suite la phagocytose des pathogènes. Cette réponse sera la plus appropriée contre des pathogènes intracellulaires (virus ou bactéries intracellulaires).

Au contraire, la sécrétion d'interleukine 4, 5 et 13 (IL-4, 5 et 13) est le facteur clé pour induire une réponse Th2, aboutissant à l'activation des lymphocytes B. Ces lymphocytes produisent alors des Ig neutralisants et signent ainsi une réponse humorale, étant la plus appropriée contre des pathogènes extracellulaires comme les parasites métazoaires (helminthes en particulier). La plupart des lymphocytes B et T meurent rapidement mais une petite partie d'entre eux survivent et assurent une « mémoire » contre les antigènes déjà rencontrés. Ils assurent ainsi une réponse plus rapide et plus intense en cas de ré-exposition au même antigène.

Les modèles murins ont clairement démontré une orientation Th2 de la réponse immunitaire adaptative lors d'infestations par des nématodes gastro-intestinaux (*Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis* et *Trichuris muris*) (Finkelman et al., 1997 ; Behm et Ovington, 2000; Meeusen et Balic, 2000). Il en est de même chez le mouton infesté par *H. contortus* (Lacroux et al., 2006), *Trichostrongylus colubriformis* (Pernthaner et al., 2005) ou *Teladorsagia circumcincta* (Craig et al., 2007). L'interleukine 5 sécrétée en abondance par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 entraîne une hyperéosinophilie sanguine ainsi que l'infiltration des muqueuses parasitées par ces cellules.

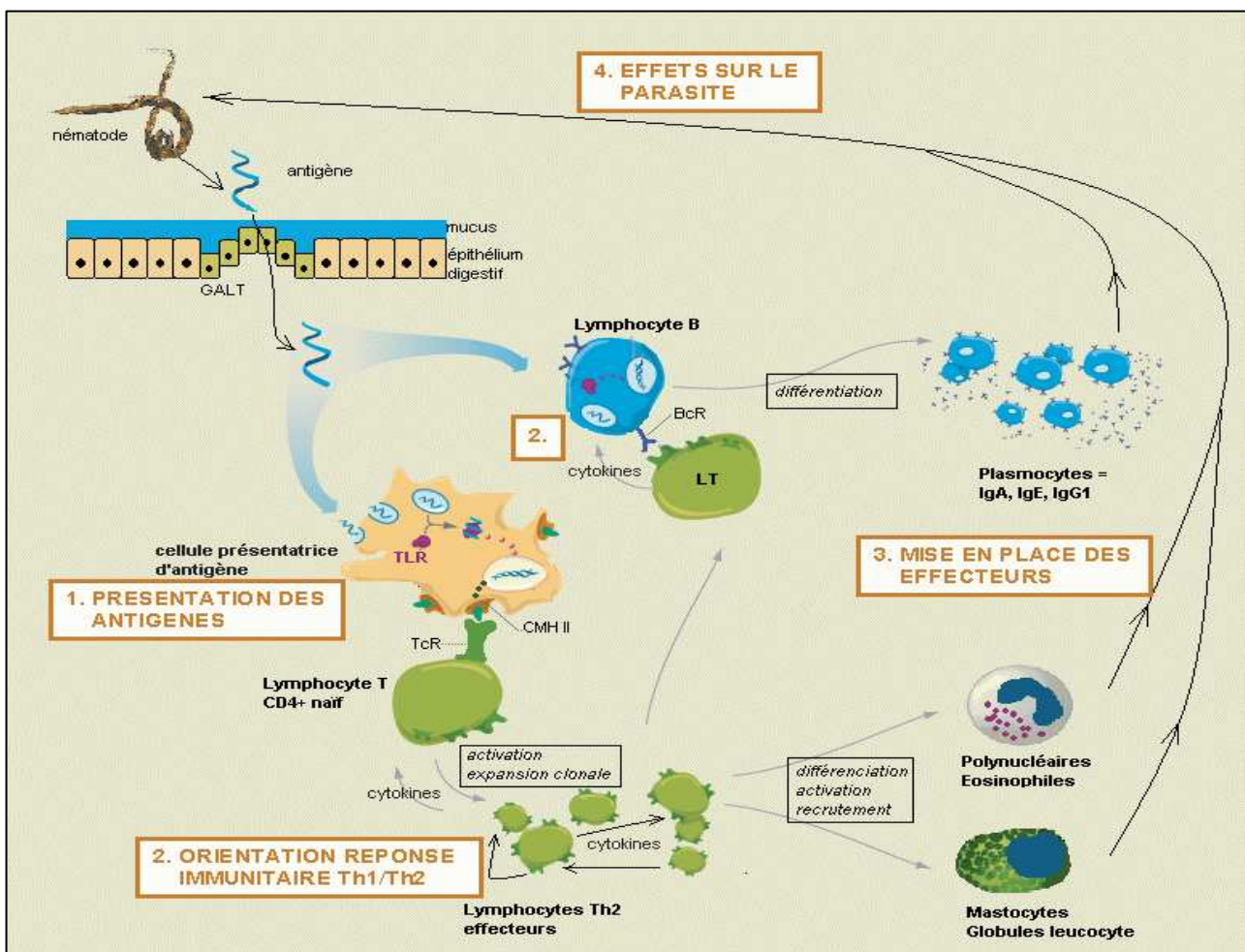
- **Rôles des polynucléaires éosinophiles**

Il est bien établi que la réponse de l'hôte contre les helminthes est caractérisée par une éosinophilie systémique et tissulaire. Le polynucléaire éosinophile est souvent considéré comme une cellule protectrice pour l'hôte lors d'infestation par des helminthes. Le mode d'action de l'éosinophile serait la cytotoxicité cellulaire : la libération de protéines cationiques contenues dans les granulations cytoplasmiques, ainsi que la génération de médiateurs néoformés auraient un effet cytolytique sur le tégument des parasites, induisant une immobilisation des larves et des lésions cuticulaires conduisant à leur mort (Rothenberg et Hogan, 2006). *In vitro*, les éosinophiles sont capables d'immobiliser et de tuer les larves d'*H. contortus* en présence d'anticorps spécifiques anti-L3 (Terefe et al., 2007a), ce qui suggère que les éosinophiles pourraient être des effecteurs dans la



résistance des ovins aux strongles gastro-intestinaux. Cette hypothèse est également étayée *in vivo* par l'observation histologique de tissus de l'hôte: de nombreux polynucléaires éosinophiles sont retrouvés en association étroite avec des parasites intacts ou endommagés (Balic et *al.*, 2006). Toutefois, les avis restent partagés sur le rôle exact des éosinophiles à l'encontre des helminthoses (Fabre et *al.*, 2009). En effet, les dommages de la muqueuse induits par les polynucléaires éosinophiles pourraient fournir un micro-environnement bénéfique à l'installation et au développement de *Trichinella spiralis* chez la souris.

Enfin, un rôle non négligeable des polynucléaires éosinophiles *in vivo* serait leur production de certaines cytokines dans leur environnement immédiat, en particulier l'IL-3 et l'IL-5, suggérant un rôle dans la mastocytose associée aux infestations helminthiques ainsi que dans l'amplification de l'éosinophilie via une activité IL-5 autocrine ou sur les autres polynucléaires éosinophiles (Rothenberg et Hogan, 2006).



**Figure 3.** Organisation générale de la réponse immunitaire adaptative (d'après Lacroux, 2006)

Abréviations: GALT: Gut-associated lymphoid tissue, TcR : T cell receptor, TLR: Toll-like receptors



## 2.7. Moyens et méthodes de lutte

### 2.7.1. Les principales anthelminthiques utilisés

La lutte contre les infestations par les strongles gastro-intestinaux consiste tout d'abord à traiter les animaux à l'aide de produits anthelminthiques. Ce moyen de contrôle est actuellement le plus répandu chez les éleveurs. Les trois familles de molécules les plus utilisées sont les **lactones macrocycliques**, les **benzimidazolés** et les **imidazothiazoles**, auxquels s'ajoute la famille des **salicylanilides**, actifs uniquement contre les strongles hématophages (Tableau 2).

**Tableau 2.** Liste de quelques molécules actives recommandées contre l'haemonchose chez les ovins (Dictionnaire des médicaments vétérinaires, 13<sup>ème</sup> édition, 2005 ; Terefe, 2007).

Groupe chimique	Molécules	Dose	Voie d'administration / Espèce	Délai d'attente	
				Lait	Viande (J)
IMIDAZOTHIAZOLES	Lévamisole	7,5 mg/kg	VO, Inj, Bolus, Pour On	Non	3-28
	Albendazole			Non	10
BENZIMIDAZOLES	Fenbendazole	5 mg/kg	VO	Oui	8
	Oxfendazole				14
LACTONES MACROCYCLIQUES	Ivermectine	0,2 mg/kg	SC, VO (Ov)		3 – 42
	Moxidectine	ou 0,5 mg/kg	Pour On	Non	14 – 52
SALICYLANILIDES	Closantel	10 mg/kg	SC (Bv) VO (Bv, Ov)	Non	28

### 2.7.2. Tarissement des sources de contamination

Tarir la source de contamination consiste à minimiser au maximum le contact entre les ovins et les larves infestantes (Hoste et *al.*, 1997; Paolini, 2004; Heckendorn, 2007). Dans cet objectif, plusieurs catégories de méthodes ont été décrites:

- **Méthode préventive**, consistant à placer des animaux sains sur des parcelles exemptes de larves infestantes ;
- **Méthode évasive** ou ‘Treat and Move’, consiste à transférer des animaux traités par des anthelminthiques de pâtures contaminées vers des pâtures propres ;
- **Méthodes par dilution**, consiste à diluer l’infestivité du pâturage par l’utilisation de plusieurs types d’hôtes (bovins et ovins, ou équins et ovins) (pâturage mixte) ou avec un seul type d’hôte (la différence de sensibilité entre ovins jeunes et adultes peut être mise à profit afin de réduire la pression d’infection rencontrée par les animaux jeunes qui sont les plus réceptifs ; le principe général consiste à ce que les jeunes animaux précèdent toujours les adultes sur des parcelles saines) ;

Le succès de ces méthodes repose avant tout sur une gestion rigoureuse des systèmes de pâturage. Cependant, cette gestion est en général établie selon des motifs agronomiques de valorisation des parcs fourragers et d’herbe sur pied ; la prise en compte du risque parasitaire n’étant en général considérée qu’en seconde intention (Hoste et Chartier, 1997 ; Cabaret et *al.*, 2002).

### 2.7.3. Augmentation de la résistance de l’hôte

L’amélioration de la résistance de l’hôte est une stratégie pouvant reposer soit sur **la vaccination**, soit sur **l’amélioration de la ration alimentaire** de l’hôte, soit sur **la sélection d’animaux résistants** aux nématodes gastro-intestinaux.

#### A. Vaccination

La vaccination contre *Haemonchus contortus* a fait l’objet de nombreuses études et certains antigènes potentiellement protecteurs sont aujourd’hui bien caractérisés. Toutefois, aucun vaccin commercialisé n’est actuellement disponible pour lutter contre les strongyloses gastro-intestinales des ruminants et l’espoir d’un vaccin à court ou même moyen terme est infinitésimal.

#### B. Amélioration de la ration alimentaire de l’hôte

- Les tannins condensés de certaines plantes induiraient une réduction de l’excrétion fécale des œufs de parasites et, dans une moindre mesure, une réduction du nombre de vers installés et de la fertilité des femelles. Toutefois, les résultats obtenus sont très variables en fonction des plantes, des espèces d’hôtes et de parasites considérées (Hoste et *al.*, 2004).

- L'infestation par les nématodes gastro-intestinaux provoque une réduction de la prise alimentaire des animaux, une perturbation de la digestion et de l'assimilation des nutriments avec des conséquences néfastes sur le métabolisme protéique (Coop et Holmes, 1996). La supplémentation en protéines serait capable d'augmenter la résilience et la résistance des moutons à ce type d'infestation parasitaire (Louvandini et *al.*, 2006).

### **C. La sélection d'animaux résistants**

L'utilisation d'animaux génétiquement sélectionnés pour leur résistance aux infestations par les strongles gastro-intestinaux offre la possibilité de diminuer la contamination de l'environnement et le nombre de traitements anthelminthiques nécessaires dans l'année et de freiner la diffusion de la chimiorésistance au sein des populations de nématodes. La mise en œuvre pratique de cette méthode est rendue possible par l'estimation de l'intensité de l'excrétion d'œufs dans les matières fécales (OPG) en infestations naturelles ou artificielles. Toutefois, cette technique est trop lourde à développer sur de très grands effectifs. La sélection assistée par marqueurs proches de gènes de résistance ou bien par les mutations des gènes eux-mêmes pourrait prédire la valeur génétique d'un individu à la naissance sans passer par une mesure ultérieure de son phénotype. Les outils moléculaires de cette sélection sont actuellement à l'étude. Les limites potentielles de la sélection génétique ne doivent pas être négligées comme une plus grande sensibilité à d'autres pathogènes (virus, bactéries ou protozoaires) ou une adaptation des parasites à des hôtes résistants (Jacquiet et *al.*, 2009).

**Partie**

**2**

---

# Etude expérimentale

## Introduction

Depuis plusieurs années, l'équipe de parasitologie de l'UMR INRA/ENVT 1225 étudie les mécanismes immunitaires des moutons lors d'infestations naturelles ou expérimentales par des strongles gastro-intestinaux, en particulier l'espèce cosmopolite *Haemonchus contortus*.

Un modèle original comprenant une race ovine tropicale résistante, la Martinik Black Belly et des races européennes sensibles, INRA 401 et Lacaune, a été développé dans notre équipe. L'étude comparée de leurs réponses immunitaires a permis de mettre en évidence des différences importantes entre ces races pour l'expression de gènes de lectines dans la muqueuse, 8 jours après une primo-infestation.

### 1. Objectifs

L'objectif de notre étude expérimentale est de réaliser une cinétique comparée de la présence de la protéine Gal-15 (Galectine 15) dans le mucus de la caillette au cours d'une primo-infestation chez des animaux de race résistante et des animaux de race sensible. Des évaluations des populations parasites et des analyses de physiopathologie viendront compléter ces mesures.

### 2. Matériels et méthodes

#### 2.1. Matériels

##### 2.1.1. Les ovins

##### 2.1.1.1. Ovins de race Martinik Black Belly

Les ovins Martinik Black Belly représentent l'une des races ovines dites "à poils ou sans laine" rencontrées aux petites Antilles (Martinique, Caraïbe,...) et caractérisées par un ventre et des extrémités noirs (Photo 3). Ces ovins ont été introduits aux Antilles à partir du XV<sup>ème</sup> siècle ; elles descendent très probablement des moutons africains de la côte du golfe de Guinée (Mahieu et *al.*, 1997 ; Naves et *al.*, 2001 ; Lacroux, 2006). Quelques dizaines d'embryons de cette race ont été importés de Guadeloupe en métropole par le centre de recherche de l'INRA (domaine INRA de la Sapinière (Cher)) dans le but initial d'étudier la saisonnalité de la reproduction. Toutefois, la race Black Belly est connue par sa résistance aux infestations par les nématodes gastro-intestinaux tels que *H. contortus* (Gruner et *al.*, 2003).

### 2.1.1.2. Ovins de race Lacaune

Les ovins de race Lacaune, avec un effectif de 1,3 million de brebis, représentent environ un cinquième du cheptel ovin français. Ils tirent leur nom du chef lieu de canton situé au milieu des monts de Lacaune dans le Tarn, à la limite de l'Aveyron et de l'Hérault. De format moyen à lourd, la brebis Lacaune pèse de 70 à 80 kg pour une hauteur au garrot de 70 à 80 centimètres. Les mâles pèsent de 95 à 110 kilogrammes. La race se caractérise par une tête fine au profil légèrement busqué et l'absence de cornes. La laine forme une toison fine de 1,5 à 2 kilogrammes (2,5 kilogrammes pour les béliers) laissant à découvert la tête, le cou, les pattes et le ventre, toutes parties recouvertes de fins poils blancs (Photo 4).

Il existe deux rameaux en race Lacaune : l'un spécialisé pour produire du lait, et l'autre pour produire de la viande.



**Photo 3.** Brebis de race Black Belly  
([www.blackbellysheep.org](http://www.blackbellysheep.org))



**Photo 4.** Brebis de race Lacaune  
([http://fr.academic.ru/pictures/frwiki/66/Brebis\\_lacaune.jpg](http://fr.academic.ru/pictures/frwiki/66/Brebis_lacaune.jpg))

### 2.1.1.3. Age, sexe et entretien des animaux

L'étude expérimentale a porté sur des agneaux de 6 mois d'âge ; 16 agneaux de race Martinik Black Belly (8 mâles / 8 femelles) fournis par la station expérimentale INRA de Bourges, de paternités connues et 12 agneaux de race Lacaune (8 mâles / 4 femelles) nés à l'ENVT dont les paternités multiples n'étaient pas connues. De leur naissance à l'autopsie, ils ont été maintenus à l'intérieur de bâtiments et alimentés avec du foin à volonté et du concentré afin d'éviter toute infestation accidentelle. Un traitement anthelminthique par voie orale (Ivermectine ORAMEC® Ovin 0.2 mg/kg) a été administré à ces agneaux, 15 jours avant la primo-infestation pour s'assurer de l'absence de toute contamination (Tableaux 3 et 4).

**Tableau 3.\*** Agneaux de race Black Belly

N° agneau	genre	lot
98060	♀	J0
98021	♀	J0
98111	♀	J4
98013	♂	J4
98006	♂	J8
98053	♂	J8
98017	♀	J8
98097	♀	J8
98010	♂	J15
98075	♂	J15
98005	♂	J15
98102	♂	J21
98064	♀	J21
98009	♂	J30
98089	♂	J30
98012	♀	J30

**Tableau 4.** Agneaux de race Lacaune

N° agneau	genre	lot
93481	♀	J0
94242	♀	J0
91181	♂	J4
91381	♂	J4
92981	♂	J8
93071	♂	J8
92441	♂	J15
91071	♀	J15
93482	♀	J21
91741	♂	J21
91182	♂	J30
91611	♂	J30

\* Chaque couleur correspond à un bélier (père). Les agneaux de même père ont été distribués à des lots différents afin d'éviter un effet « père » à certaines dates.

Dans la répartition des agneaux Black Belly dans les différents lots, certaines dates ont été privilégiées (plus de deux animaux dans le groupe) : J<sub>8</sub> car nos premières analyses d'expression du gène de Gal-15 concernaient cette date, J<sub>15</sub> car selon Terefe et *al.*, (2009), les différences de charges parasitaires sont déjà bien accentuées à cette date et J<sub>30</sub> car nous voulions confirmer qu'à cette date, les vers femelles sont plus petits chez les Black Belly que chez des animaux de race sensible (Terefe et *al.*, 2007b).

### 2.1.2. Les parasites

Les larves d'*H. contortus* utilisées proviennent de la souche « Humeau » isolée d'un élevage caprin dans la région du Quercy. Les larves infestantes sont récoltées à partir de coprocultures des matières fécales d'ovins infestés expérimentalement. Les larves utilisées en expérimentation ont environ 1 à 2 mois d'âge et sont conservées à 8°C.

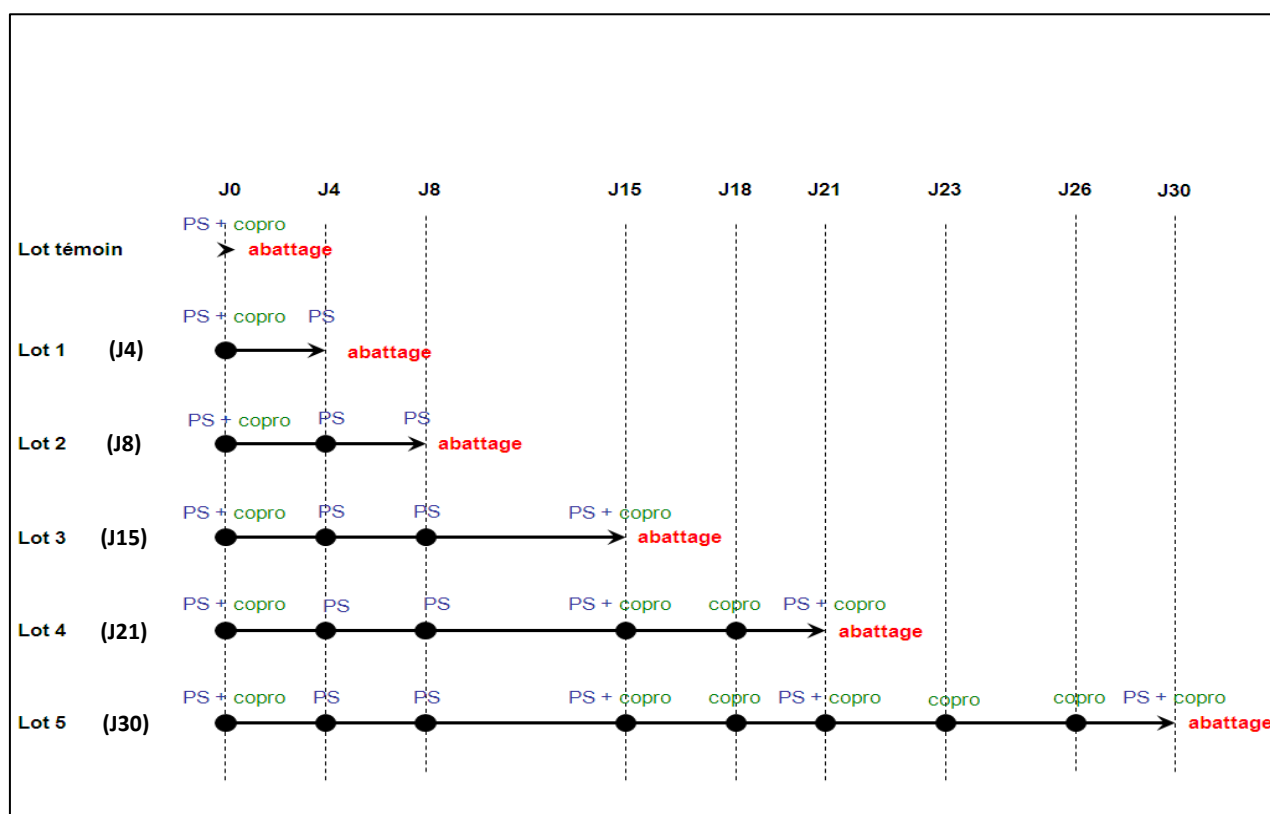
## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Dispositif expérimental

Les ovins ont été infestés par voie orale, avec une seule dose de 10 000 L<sub>3</sub>. Une telle dose est suffisante pour entraîner une réponse chez l'hôte, mais n'entraîne pas de signes cliniques extrêmes voire la mort des animaux au cours de l'expérimentation.

Ces animaux ont été divisés en 6 lots et le protocole expérimental suivant a été respecté (Figure 4):

- Infestation à J<sub>0</sub> de tous les lots sauf le lot témoin ;
- Abattages à: J<sub>0</sub> (lot témoin), J<sub>4</sub> (lot 1), J<sub>8</sub> (lot 2), J<sub>15</sub> (lot 3), J<sub>21</sub> (lot 4), J<sub>30</sub> (lot 5) post-inoculation;
- Prises de sang à : J<sub>0</sub>-J<sub>4</sub>-J<sub>8</sub>-J<sub>15</sub>-J<sub>21</sub>-J<sub>30</sub> ;
- Examens coproscopiques à : J<sub>0</sub>-J<sub>15</sub>-J<sub>18</sub>-J<sub>21</sub>-J<sub>23</sub>-J<sub>26</sub>-J<sub>30</sub>.



**Figure 4.** Le protocole expérimental

Abréviations : PS : Prise de Sang, Copro : Examen Coproscopique

Le choix des dates (J<sub>4</sub>, J<sub>8</sub>,...) a été fixé en fonction de la biologie du parasite : à J<sub>4</sub>, toutes les larves implantées doivent être au stade 4 ; à J<sub>8</sub>, on commence à voir les premiers vers immatures ; à J<sub>15</sub>, la majorité des vers doit être au stade immature ; à J<sub>21</sub>, une grande partie des vers doit être au stade adulte, enfin, à J<sub>30</sub>, tous les vers présents doivent être au stade adulte.

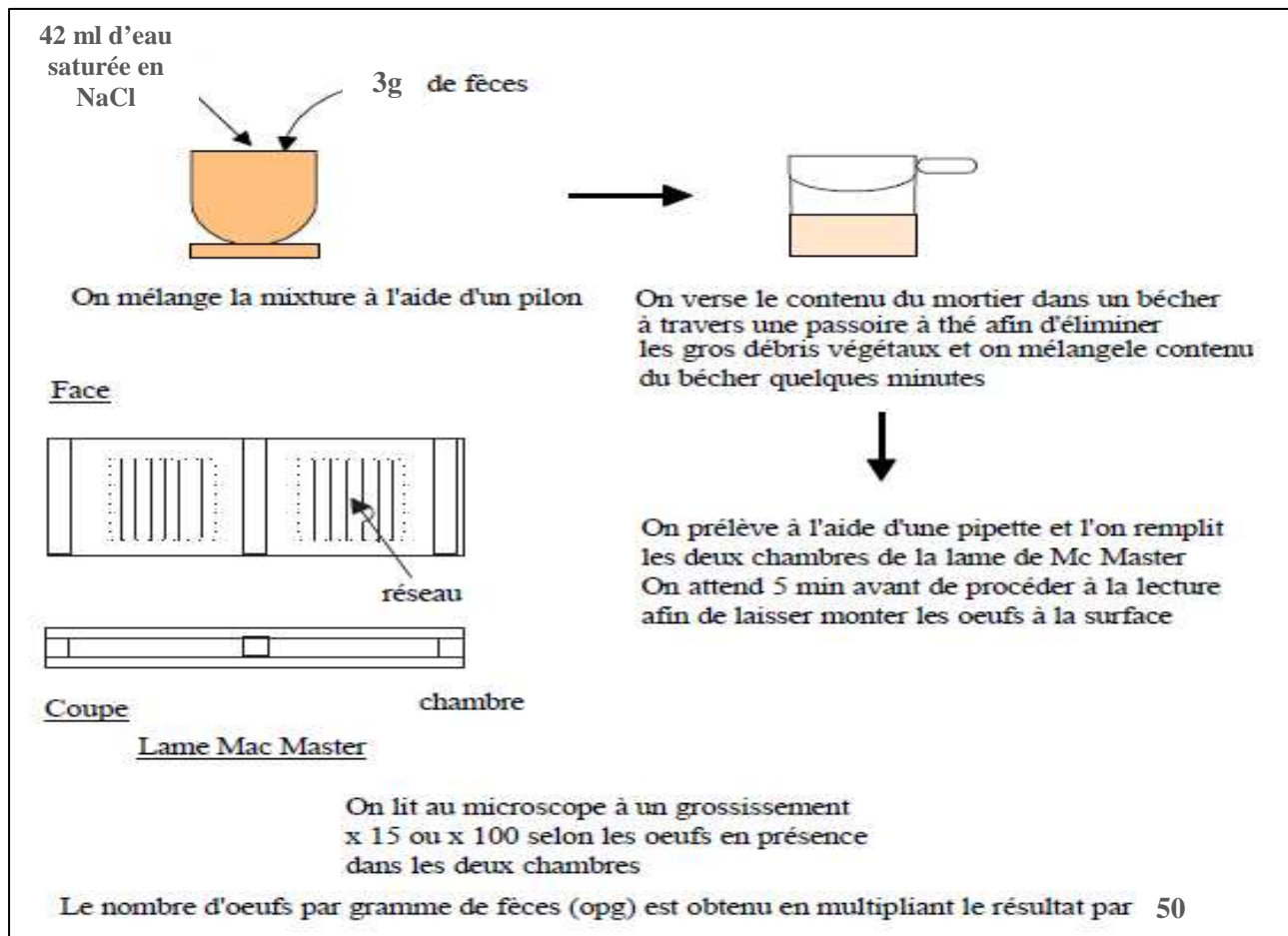


### 2.2.2. Ante mortem

#### 2.2.2.1. Examen coproscopique quantitatif (OPG)

L'examen coproscopique est une technique courante pour le diagnostic et l'évaluation du niveau d'infestation du mouton par *Haemonchus contortus*. Le nombre d'œufs de strongles par gramme de matières fécales (ou OPG) est évalué par la technique de Mac Master, modifiée par Raynaud (1970).

Un volume de 42 ml de solution saturée de chlorure de sodium NaCl ( $d=1,19$ ) est ajouté à une quantité de 3 g de fèces. Le mélange obtenu est filtré sur une passoire à thé. Ensuite, un aliquote est prélevé pour remplir les cellules d'une lame de Mac Master. Le comptage s'effectue sous microscope optique au grossissement X100 (Figure 5) (voir annexe III).



**Figure 5.** Méthode de Mac Master modifiée par Raynaud (d'après Deltour, 2000)

#### **2.2.2.2. Cinétique des mesures d'hématocrite**

L'hématocrite est estimé à partir de sang récupéré sur les tubes EDTA à la jugulaire. L'analyse doit cependant être réalisée dans la demi-journée suivant le prélèvement afin d'éviter l'hémolyse. Après homogénéisation, le sang est prélevé dans des tubes capillaires aux extrémités colmatées par de la pâte à modeler et placés dans une centrifugeuse (10 000 tours /mn pendant 5 minutes), permettant grâce à une grille de lecture d'établir le pourcentage de globules rouges (culot) par rapport au volume de sang total (voir annexe VI).

#### **2.2.2.3. Mesures du nombre total d'hématies, de l'hémoglobininémie, du taux de réticulocytes et de l'éosinophilie sanguine.**

Ces mesures ont été réalisées par le service de Biologie Clinique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse à partir des prélèvements de sang sur EDTA à l'aide d'un compteur hématologique (Appareil SYSMEX Inst. ID. XT-2000iV-1) (voir annexes IV, V, VII et VIII).

#### **2.2.2.4. Dosage du pepsinogène sanguin**

Les concentrations de pepsinogène sérique ont été évaluées selon la méthode décrite par Dorny et Vercruysse (1998). Brièvement, un échantillon de sérum a été acidifié avec de l'acide chlorhydrique et incubé une nuit à 37°C avec l'albumine sérique bovine (BSA). La réaction a été arrêtée avec l'acide trichloracétique (TCA) à 4% et le mélange a été centrifugé à 14000 tours / mn pendant 5 minutes. Une partie de l'aliquote (surnageant) a été ajoutée à 0,25 M de NaOH et les plaques ont été incubées à température ambiante avec le réactif de Folin pendant 30 minutes. La quantité de tyrosine libérée a été estimée par la densité optique déterminée dans un lecteur de plaque ELISA (Dynatech ImmunoAssay System) à 680 nm en utilisant une courbe standard de tyrosine. Les valeurs ont été exprimées en unité (U) ou milli unité (MU) tyrosine / litre de sérum.

### **2.2.3. *Post mortem***

#### **2.2.3.1. Etude quantitative et qualitative de la population parasitaire (Bilans parasitaires)**

Après chaque abattage, les caillettes ont été rapidement isolées du reste de l'appareil digestif et une incision a été faite sur la grande courbure. Les vers sont recherchés : (i) dans le contenu de l'organe (ainsi que dans les lavages des parois de celui-ci), (ii) mais également dans la paroi de l'organe, afin de récupérer et de dénombrer les stades parasitaires non encore matures dans la muqueuse. Pour

cela, l'organe cible est digéré dans une solution d'acide chlorhydrique / pepsine pendant 6 heures à 37°C.

Le contenu et le produit de la digestion sont filtrés sur un tamis à mailles de 40 µm afin de retenir les éléments parasitaires, puis préservées par addition d'un large volume d'éthanol 70° jusqu'à analyse. Leur volume est ensuite ajusté à 2 litres et le nombre total de vers est estimé dans un aliquote de 10 %.

En parallèle du nombre total de vers, une analyse qualitative de la population de strongles est réalisée en dénombrant les différents stades parasitaires : larves L<sub>4</sub>, vers immatures mâles et femelles, vers adultes mâles et femelles. Cette analyse, a permis d'établir le pourcentage d'installation des vers ainsi que leur degré de développement (voir annexe I). De plus, pour chaque échantillon de J<sub>21</sub> et J<sub>30</sub>, 12 à 38 femelles adultes ont été prélevées de manière aléatoire pour mesurer leur longueur (voir annexe II).

#### **2.2.3.2. Infiltration cellulaire de la muqueuse abomasale (éosinophiles)**

Après l'abattage des animaux, des tissus de la paroi de la caillette en régions fundique, intermédiaire et pylorique ont été prélevés avec un scalpel et traités comme suit :

- Les échantillons de tissus ont été plongés dans une solution de formaldéhyde à 10 % tamponnée jusqu'à leur fixation ;
- Après déshydratation dans des bains successifs d'alcool de degrés croissants et de toluène (cycle automatisé complet de 18 heures), les échantillons sont ensuite inclus en paraffine ;
- Des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées à partir des blocs à l'aide d'un microtome (Microm, France) et récupérées sur des lames prétraitées (lames Superfrost Plus, Labonord, France) ;
- Ces coupes histologiques ont été ensuite colorées selon le protocole classique d'Hémalun-éosine (Terefe et *al.*, 2009).

Les éosinophiles ont été comptés au grossissement X400 et les résultats ont été exprimés par la somme du nombre des éosinophiles observés dans 5 champs microscopiques, sélectionnés de manière aléatoire, par couche histologique (sous muqueuse, lamina propria et position intra épithéliale) et pour chaque région anatomique de la caillette (région fundique, pylorique et intermédiaire entre fundus et pylore) (voir annexe X).

### **2.2.3.3. Mise en évidence de la protéine Gal-15 dans le mucus**

A l'abattage, le mucus de la région fundique a été récupéré en grattant délicatement la surface de l'organe avec une lame de scalpel. Le produit de grattage a été mélangé à du PBS (2 mL) puis stocké à -20°C.

Les concentrations en protéines totales des différents échantillons ont été évaluées à l'aide du test Bicinchoninic Protein Assay (Pierce, Rockford, Illinois, USA) (voir annexe IX). Les concentrations ont toutes été ajustées à  $500 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ .

Les protéines des échantillons de mucus ont été séparées sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (électrophorèse à 120 Volt pendant 1h 45 mn). Par la suite, une partie des gels a été colorée avec le bleu de Coomassie afin de visualiser les protéines majeures du mucus pour chaque animal (voir annexe XII).

Une autre partie des gels a fait l'objet d'un transfert de protéines sur membranes de PVDF (électrotransfert à 250 mA pendant 40 mn). Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire pendant 90 minutes (anticorps polyclonal anti-sheep GAL-15 fourni gracieusement par le Dr. E. Meeusen de l'Université de Melbourne) puis avec un anticorps secondaire (anti-rabbit IgG peroxydase conjugate, Sigma) dilués au 1/50<sup>ème</sup> pendant 60 minutes. La révélation a été faite avec le substrat Opti-4CN<sup>TM</sup> Substrate Kit (BIO-RAD) (voir annexe XI et XIII)

### **2.2.4. Analyses statistiques**

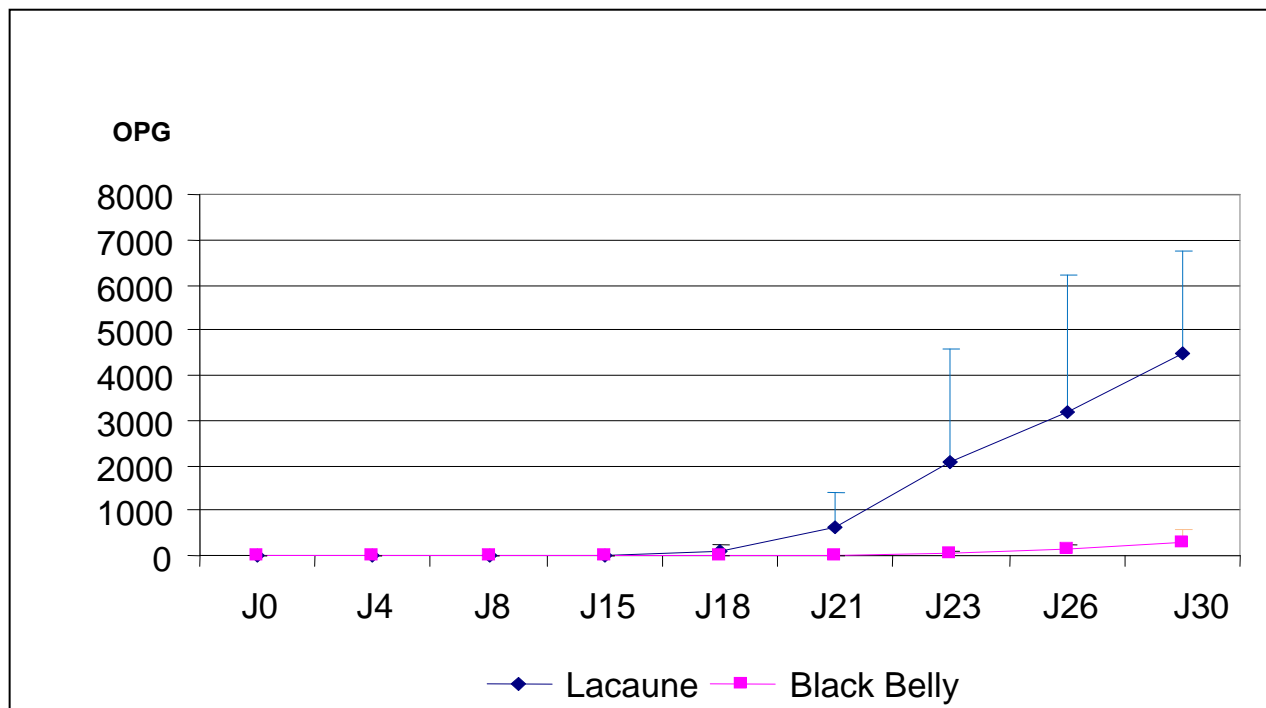
Compte tenu de la taille des groupes expérimentaux, les analyses statistiques ont consisté en des tests non paramétriques uniquement : les comparaisons de valeurs en hématologie à une date précise et les comparaisons de taille de vers femelles ont été réalisées avec le test de Kruskal-Wallis à l'aide du logiciel SYSTAT.

### 3. Résultats

#### 3.1. Ante mortem

##### 3.1.1. Comptage des œufs dans les matières fécales

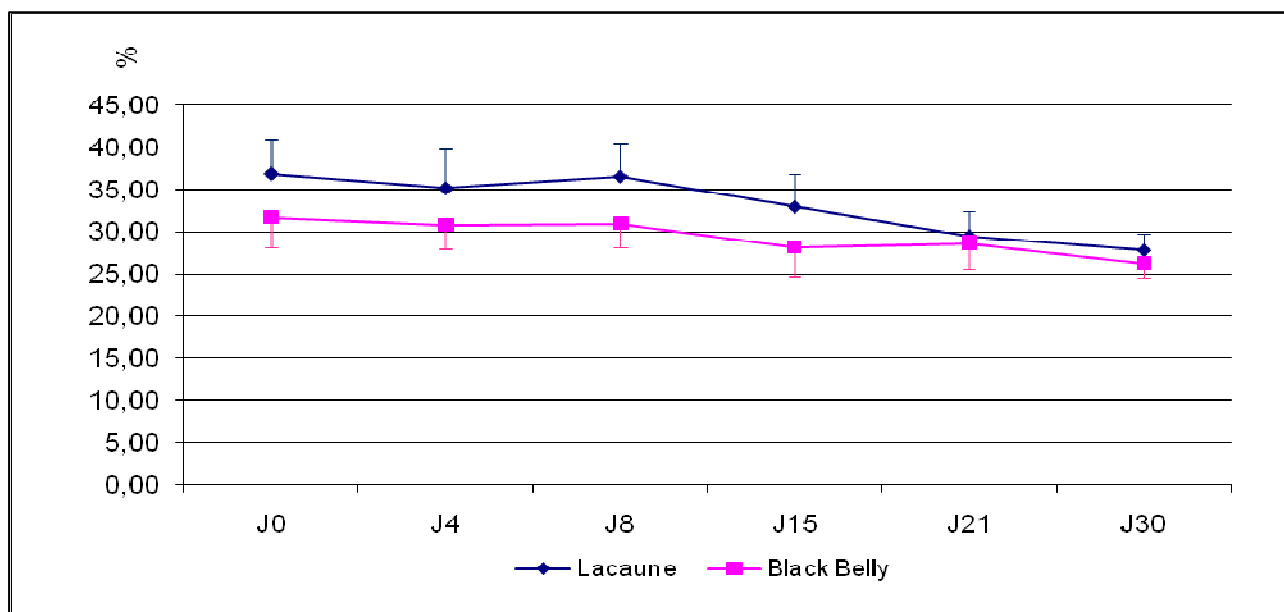
L'excrétion d'œufs débute plus tôt et avec une intensité plus élevée chez les animaux de race Lacaune ( $J_{18}$ ) que chez les Black Belly ( $J_{23}$ ). À  $J_{30}$ , l'excrétion des œufs chez les Lacaune était 17 fois plus élevée que chez les Black Belly (Figure 6).



**Figure 6.** Intensités d'excrétion d'œufs (indiquée en œufs par gramme de matières fécales ou OPG) au cours d'une primo-infestation par *Haemonchus contortus*

##### 3.1.2. Cinétique des mesures d'hématocrite

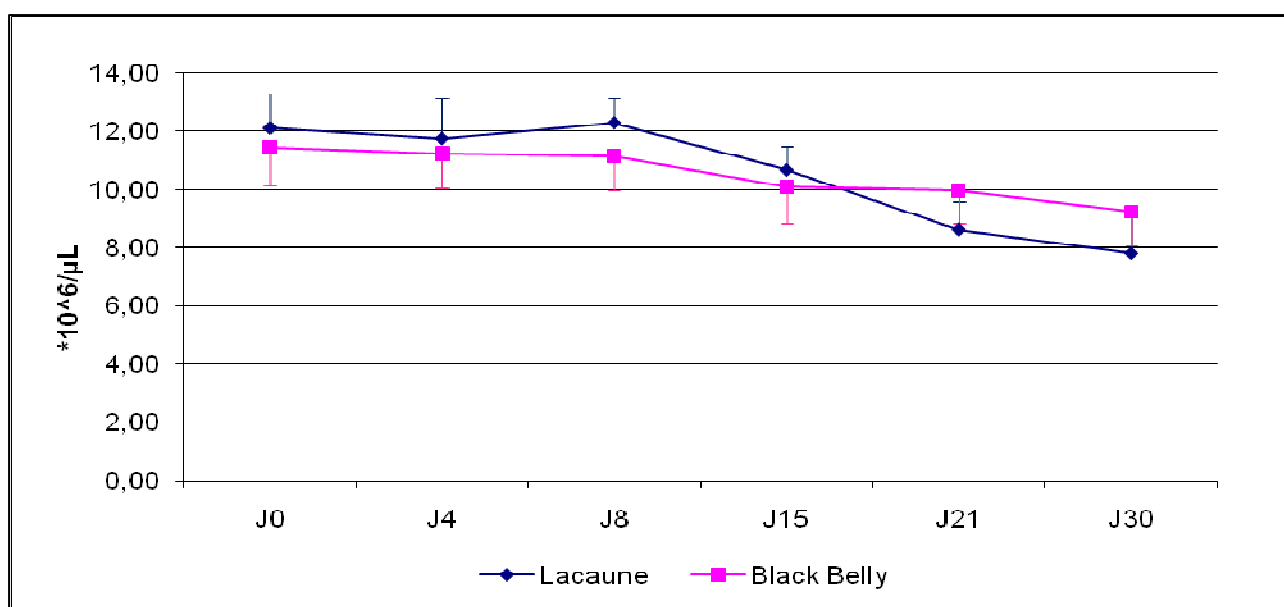
Chez les animaux de race Black Belly, le taux d'hématocrite est inférieur à celui des Lacaune avant l'infestation ( $P < 0,05$ ). Dans les deux races, une baisse est enregistrée dès  $J_{15}$  (diminution de 24 % pour les Lacaune et de 19 % pour les BB sur la totalité de la période  $J_0 - J_{30}$ ). A partir de  $J_{21}$ , les hématocrites sont presque similaires dans les deux races (Figure 7).



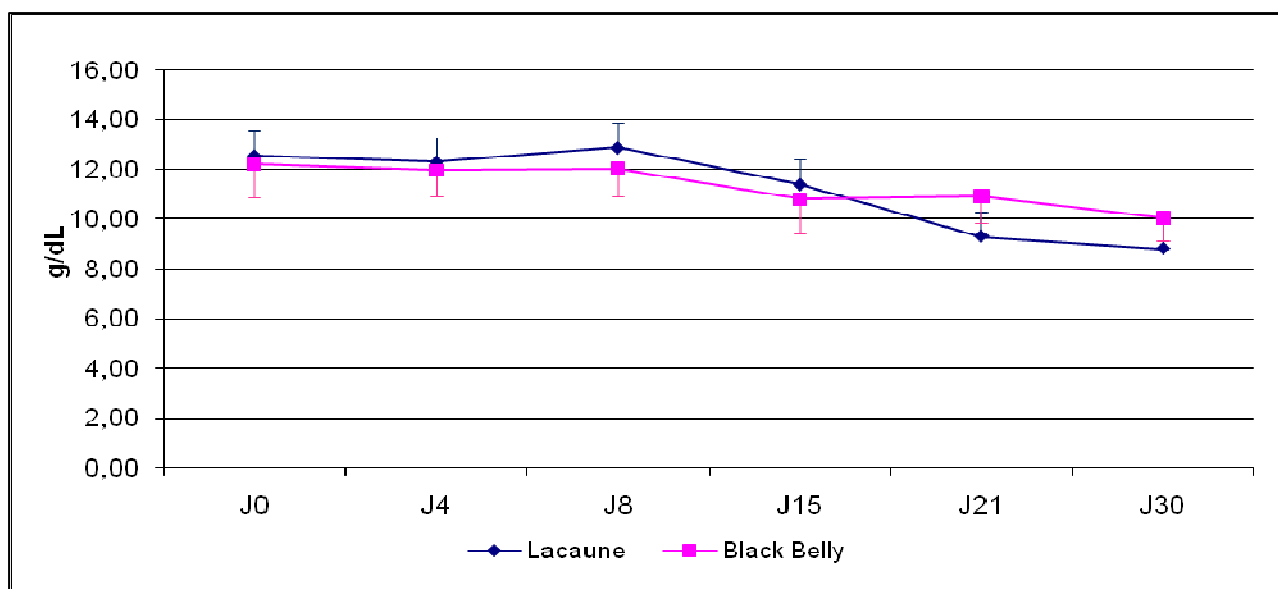
**Figure 7.** Cinétique de l'hématocrite chez les Lacaune et les Black Belly

### 3.1.3. Cinétique du nombre total d'hématies et de l'hémoglobininémie

Le nombre total d'hématies et l'hémoglobininémie diminuent dans les 2 races dès J<sub>15</sub> (Figure 8 et 9). La baisse entre J<sub>0</sub> et J<sub>30</sub> est plus importante chez les Lacaune que chez les Black Belly pour le nombre d'hématies (respectivement - 33% et - 20%) comme pour l'hémoglobininémie (respectivement -30% et -18%).



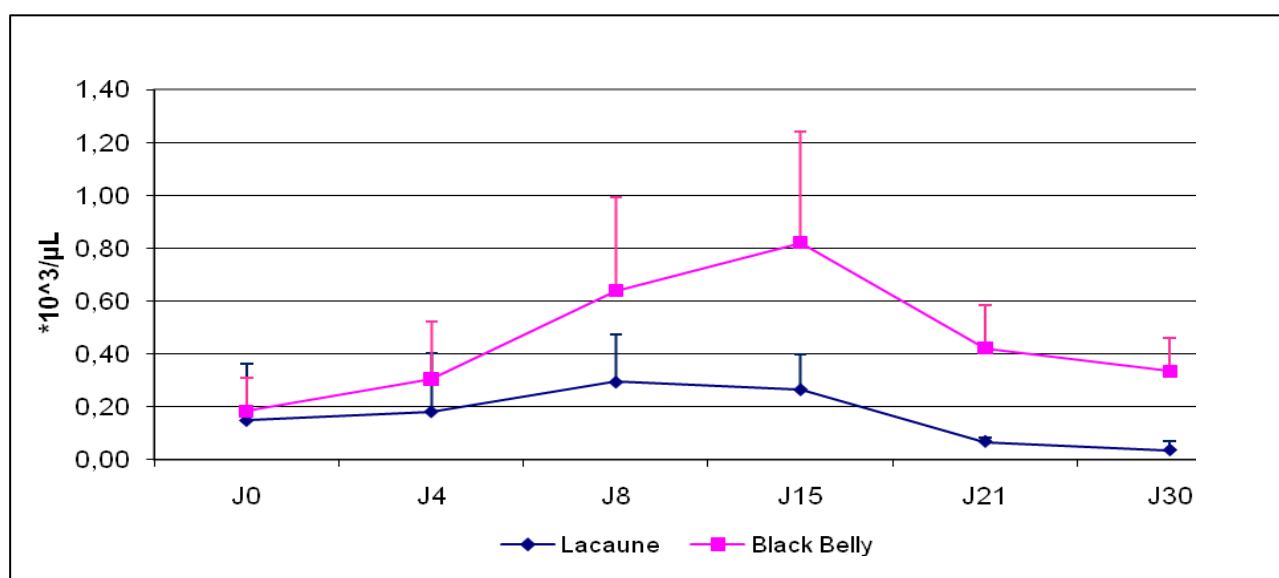
**Figure 8.** Cinétique du nombre total d'hématies par mm<sup>3</sup> chez les Lacaune et les Black Belly



**Figure 9.** Cinétique de l'hémoglobinémié chez les Lacaune et les Black Belly

### 3.1.4. Cinétique de l'éosinophilie sanguine

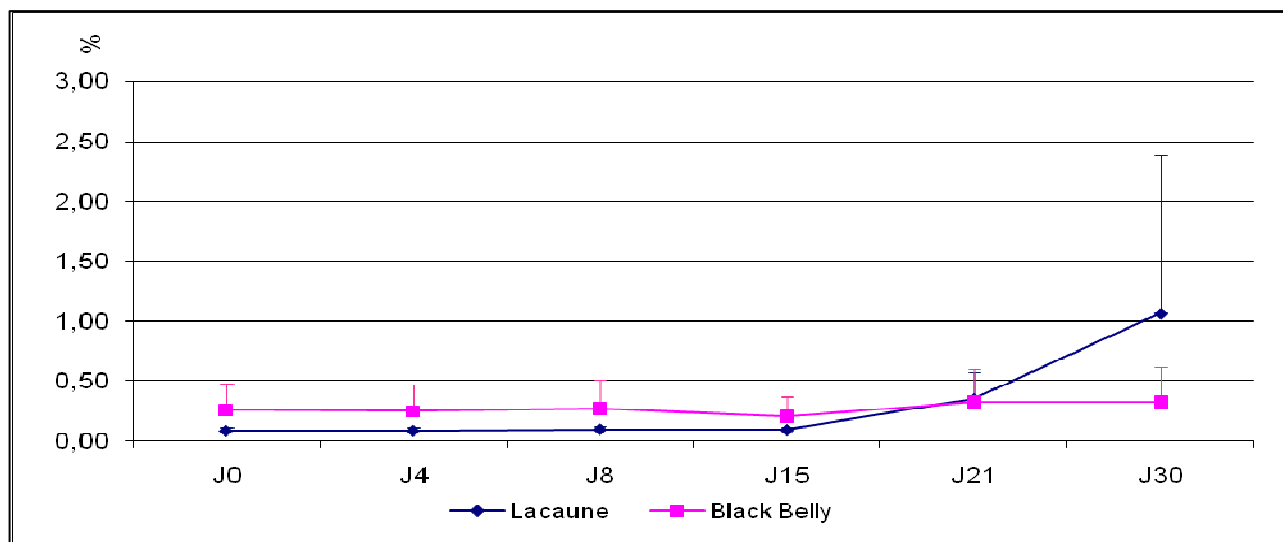
La mesure de l'éosinophilie sanguine a montré une hausse chez les Black Belly dès J<sub>4</sub> avec un pic à J<sub>15</sub> pour cette race (800 éosinophiles/ $\mu$ L soit 4,5 fois le niveau initial). Chez les Lacaune, l'augmentation n'est constatée qu'à J<sub>8</sub> (valeur maximale à 230 éosinophiles / $\mu$ L soit seulement 1,9 fois le niveau initial). A partir de J<sub>15</sub>, il y a une nette diminution de l'éosinophilie dans les deux races. L'éosinophilie sanguine atteint des valeurs inférieures au seuil initial à J<sub>21</sub> et J<sub>30</sub> chez les Lacaune tandis qu'elle se maintient à des niveaux supérieurs au niveau initial chez les Black Belly jusqu'à J<sub>30</sub>. En bilan, l'éosinophilie sanguine est significativement plus importante à J<sub>4</sub> ( $P < 0,05$ ), J<sub>8</sub> ( $P < 0,01$ ), J<sub>15</sub> ( $P < 0,01$ ) et J<sub>21</sub> ( $P < 0,05$ ) chez les Black Belly que chez les Lacaune (Figure 10). Le très petit nombre d'individus à J<sub>30</sub> relativise l'intérêt d'un test statistique.



**Figure 10.** Cinétique de l'éosinophilie sanguine chez les Lacaune et les Black Belly

### 3.1.5. Cinétique du taux de réticulocytes

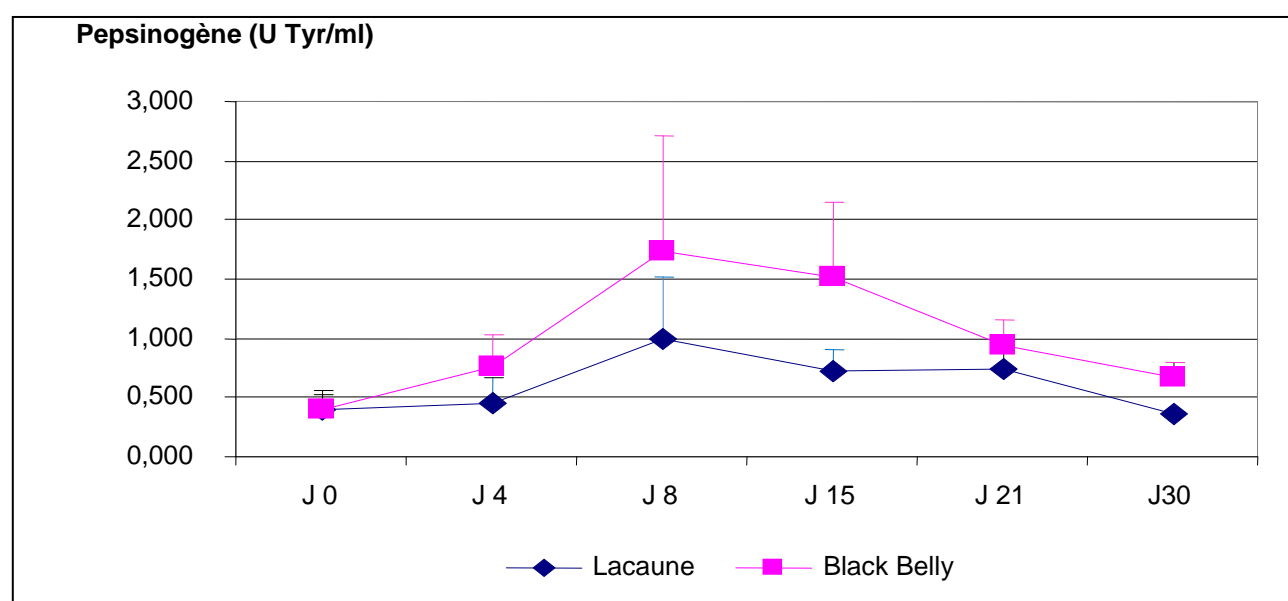
La figure 11 montre que le taux de réticulocytes entre J<sub>0</sub> et J<sub>15</sub> chez les Black Belly est très légèrement supérieur à celui des Lacaune. À partir de J<sub>21</sub>, on constate une très importante hausse du taux moyen de réticulocytes chez les Lacaune mais cette hausse est due à un individu. Le taux de réticulocytes reste stable chez les Black Belly.



**Figure 11.** Cinétique du taux de réticulocytes chez les Lacaune et les Black Belly

### 3.1.6. Dosage du pepsinogène sanguin

Les valeurs du pepsinogène sanguin chez les Black Belly sont toujours plus élevées que celles des Lacaune entre J<sub>4</sub> et J<sub>30</sub> avec un pic enregistré dans les deux races à J<sub>8</sub> (Figure 12). A J<sub>8</sub> et J<sub>15</sub>, les différences entre races sont significatives (respectivement  $P = 0,025$  et  $P = 0,01$ ).



**Figure 12.** Dosage du pepsinogène chez les Lacaune et les Black Belly

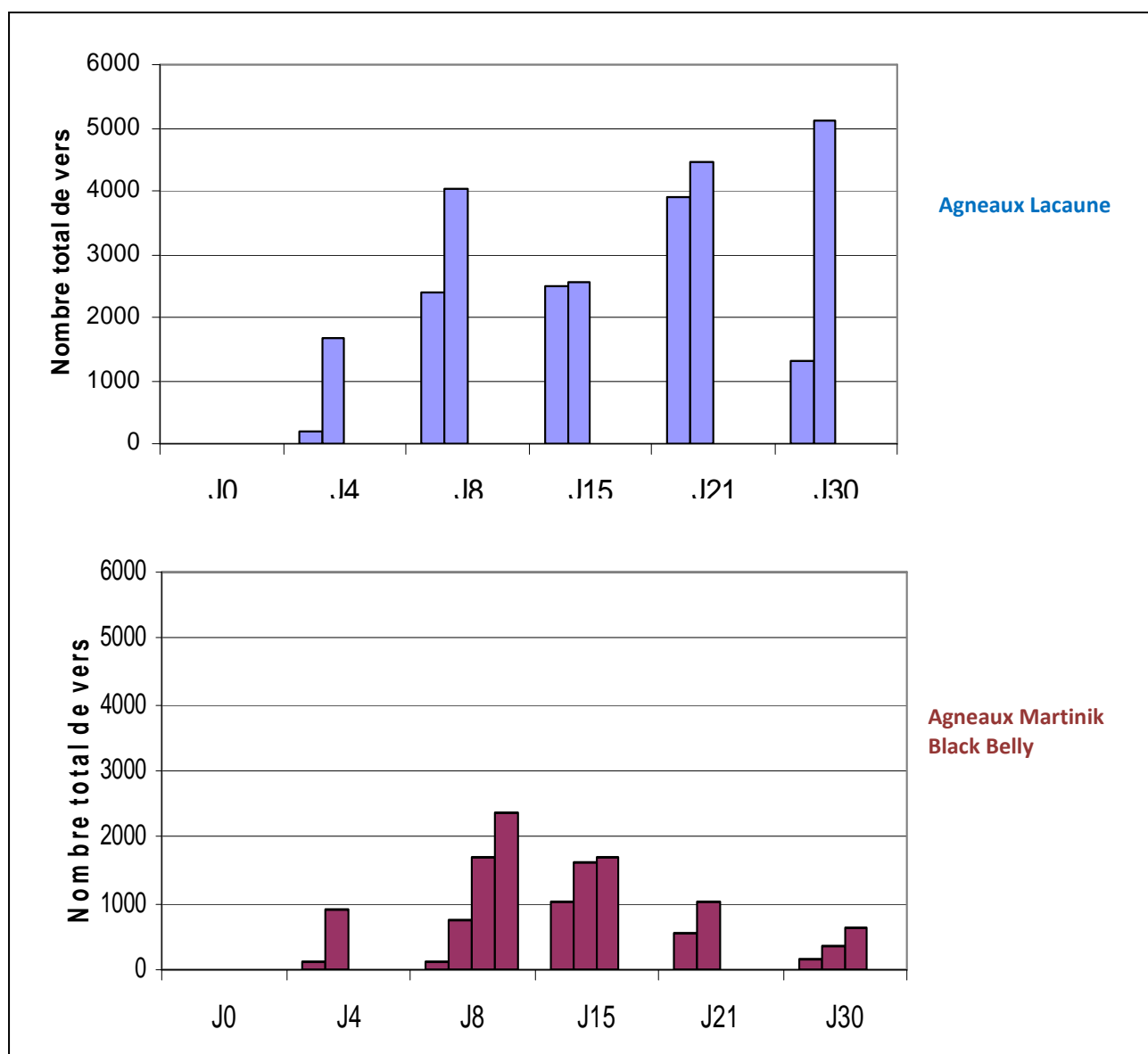


### 3.2. Post mortem

#### 3.2.1. Etude quantitative et qualitative des populations parasitaires

##### A. Nombre total de vers

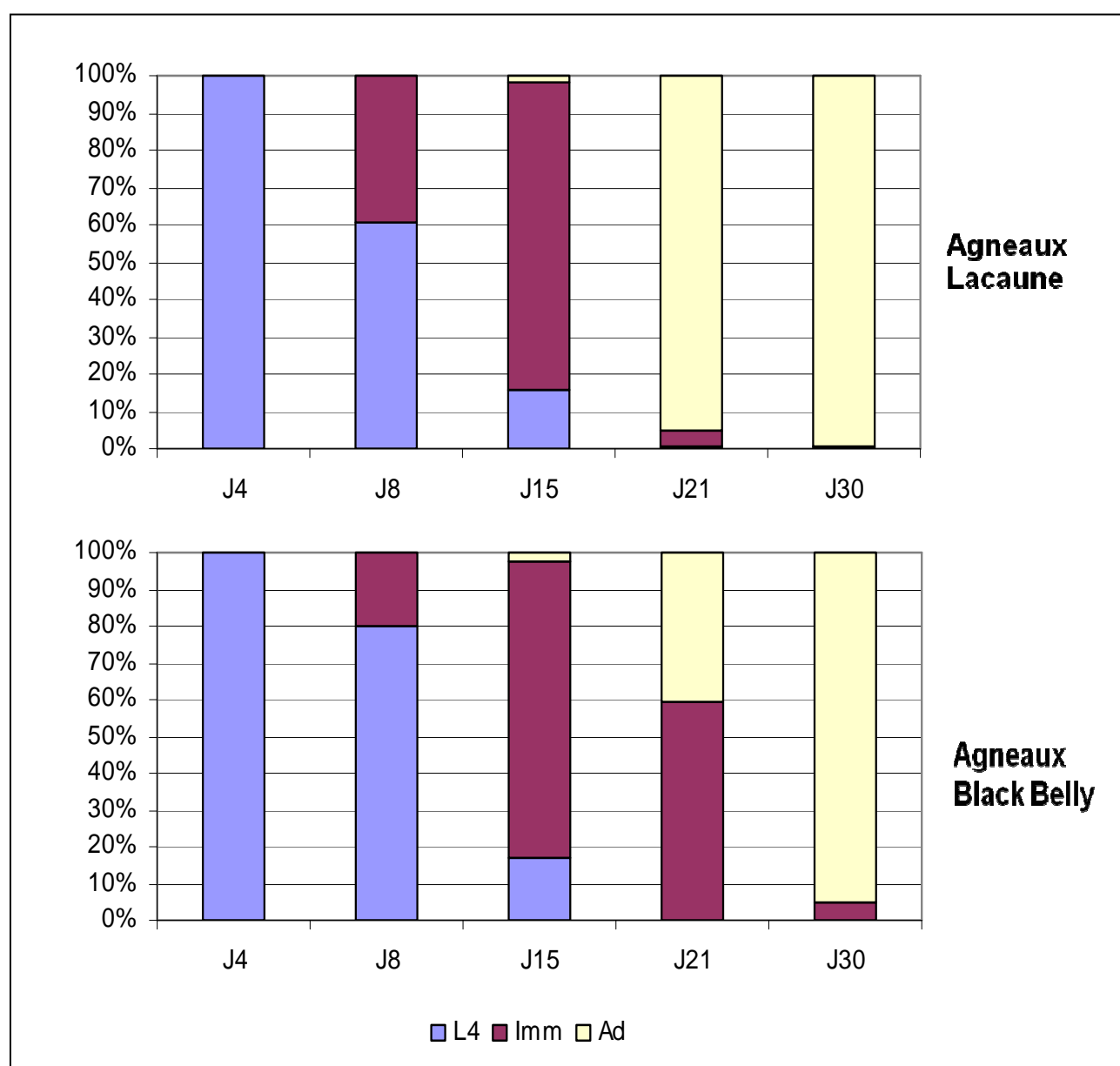
Aucun ver n'a été retrouvé dans les lots témoins. En moyenne sur toute l'étude, le pourcentage d'installation d' *H. contortus* a été de 28,1 % chez les agneaux Lacaune et de 9,3% chez les Black Belly. Le ratio nombre de vers retrouvés chez les Lacaune sur le nombre de vers retrouvés chez les Black Belly est compris entre 1,7 et 2,6 entre J<sub>4</sub> et J<sub>15</sub> puis il atteint 5,4 à J<sub>21</sub> et 8,3 à J<sub>30</sub> (Figure 13).



**Figure 13.** Nombre total de vers retrouvés à l'autopsie par animal

### B. Stades du parasite

A J<sub>4</sub>, on ne trouve que des L<sub>4</sub>. A J<sub>8</sub>, on trouve une proportion d'immatures très légèrement supérieure chez les Lacaune (40%) que chez les Black Belly (20%). A J<sub>15</sub>, les proportions des différents stades sont rigoureusement identiques dans les deux races. En revanche, à J<sub>21</sub>, une plus grande proportion de vers adultes est observée chez les Lacaune (95%) contre 41 % seulement chez les Black Belly. Toutefois, à J<sub>30</sub>, les proportions de vers adultes ne diffèrent plus entre les deux races (Figure 14).



**Figure 14.** Proportions des différents stades du parasite au cours d'une primo-infestation

### C. Longueurs moyennes des femelles adultes

La mesure de la taille des femelles d'*H. contortus* récoltées à 21 et 30 jours post-inoculation a révélé des différences nettes entre les races : les femelles récoltées chez les animaux Black Belly sont significativement plus petites ( $P < 0,001$ ) que celles récoltées chez les agneaux de race Lacaune (respectivement -26% à J<sub>21</sub> et - 32% à J<sub>30</sub>) (Tableau 5).

**Tableau 5.** Longueurs moyennes des femelles adultes à J<sub>21</sub> et J<sub>30</sub> : comparaison entre les deux races

Race	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
<b>Lacaune</b> (2 animaux par date)	14,5 mm +/- 2,8 (N = 32) 14,1 mm +/- 1,6 (N = 32)	17,85 mm +/- 2 (N = 28) 20,43 mm +/- 2,4 (N = 23)
<b>Black Belly</b> (2 animaux à J <sub>21</sub> et 3 à J <sub>30</sub> )	9,7 mm +/- 1,9 (N = 17) 11,4 mm +/- 1,6 (N = 36)	12,43 mm +/- 2,6 (N = 14) 12,36 mm +/- 3,1 (N = 11) 14,33 mm +/- 2,3 (N = 15)

#### 3.2.2. Infiltration cellulaire de la muqueuse abomasale (éosinophiles)

A J<sub>0</sub>, de très rares éosinophiles ont été observés dans les muqueuses des caillottes d'animaux témoins et ce, quelque soit la race ou la région anatomique de l'organe (Figures 15 à 17). Dans la région du fundus, le recrutement des éosinophiles débute dès J<sub>4</sub> chez les BB, il est retardé à J<sub>8</sub> chez les agneaux Lacaune (Figure 15). Par la suite et durant toute la période d'étude, l'infiltration éosinophilique semble plus prononcée chez les BB que chez les Lacaune, la différence étant particulièrement nette à J<sub>8</sub>. La présence d'éosinophiles en position intraépithéliale n'est prononcée qu'à J<sub>15</sub>. Dans la région intermédiaire (Figure 16), on retrouve des résultats similaires si ce n'est que le recrutement éosinophilique semble plus prononcé dès J<sub>4</sub> chez les BB. Dans la région du Pylore (Figure 17), très peu d'éosinophiles sont observés précocement (J<sub>4</sub> et J<sub>8</sub>) tandis qu'ils sont nombreux y compris en position intraépithéliale, à J<sub>15</sub>, dans les deux races. A J<sub>21</sub> et J<sub>30</sub>, une forte diminution du nombre d'éosinophiles est notée chez les Lacaune tandis que leur nombre s'accroît à J<sub>21</sub> chez les BB et se maintient à des niveaux élevés à J<sub>30</sub> dans cette race.

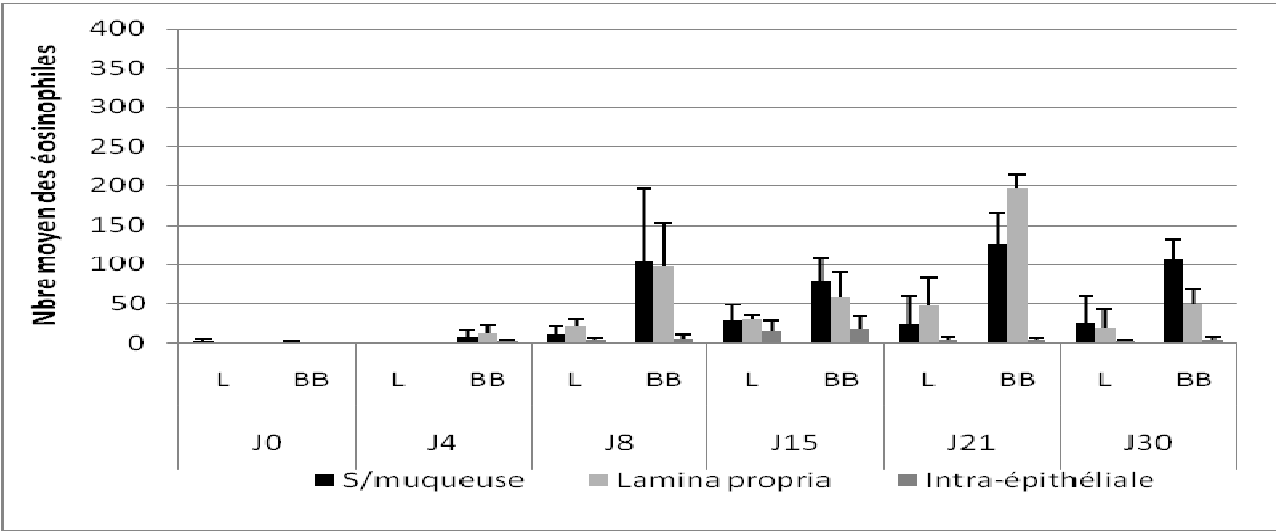


Figure 15. Nombre moyen des éosinophiles dans la région du Fundus (L : Lacaune ; BB : Black Belly)

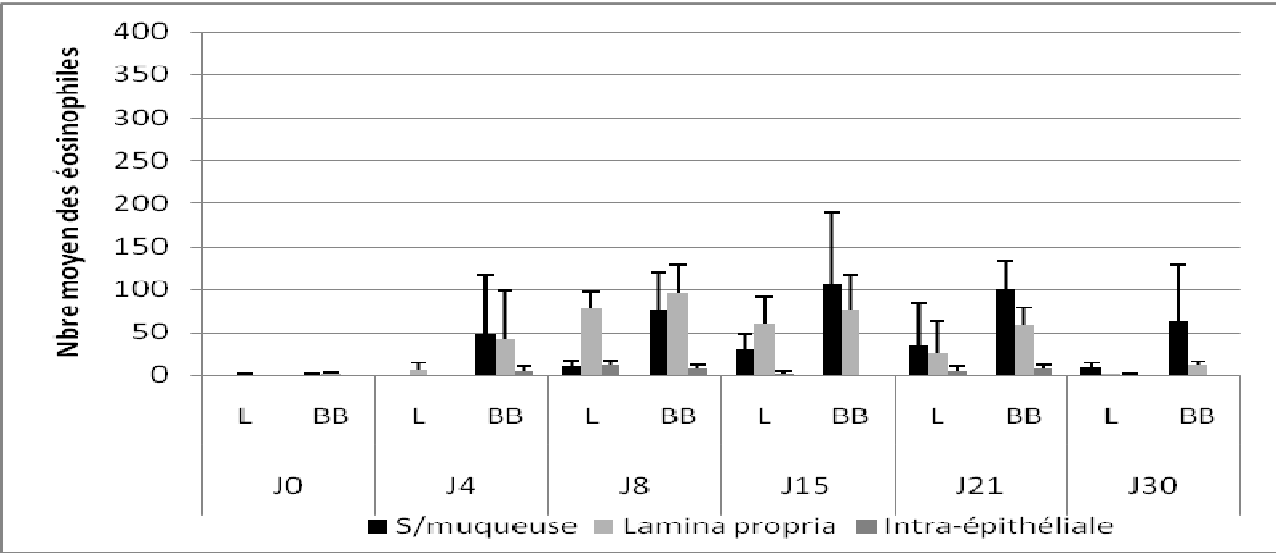


Figure 16. Nombre moyen des éosinophiles dans la région Intermédiaire (L : Lacaune ; BB : Black Belly)

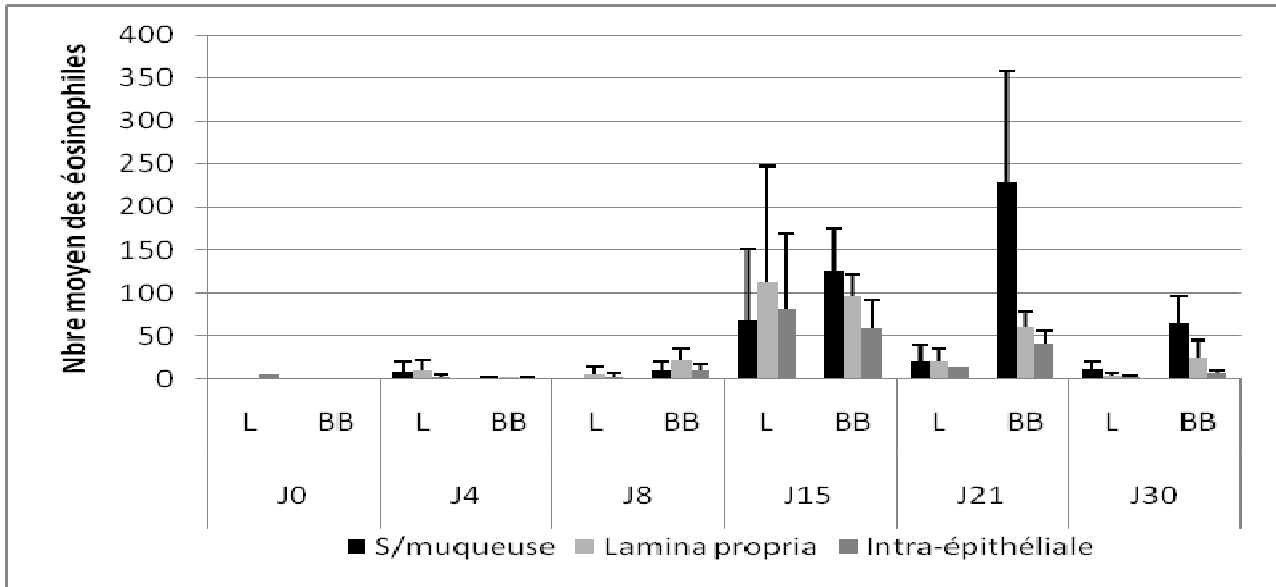
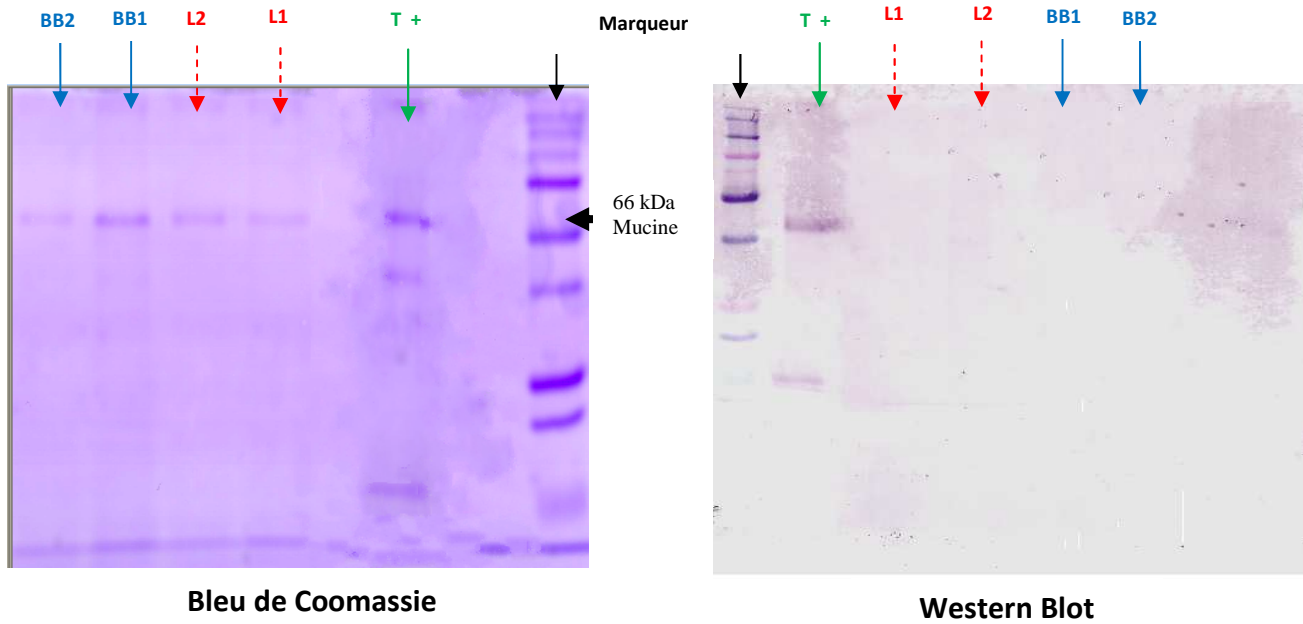


Figure 17. Nombre moyen des éosinophiles dans la région du Pylore (L : Lacaune ; BB : Black Belly)

### 3.2.3. Cinétique de la présence de la protéine Gal-15 dans le mucus abomasal

Chez les animaux non infestés ( $J_0$ ), le gel coloré au bleu de Coomassie fait apparaître une seule bande à 66 kDa qui correspond au poids moléculaire de la mucine ovine. Cependant, aucune bande n'est révélée par western blot chez les Lacaune comme chez les Black Belly (Figure 18).

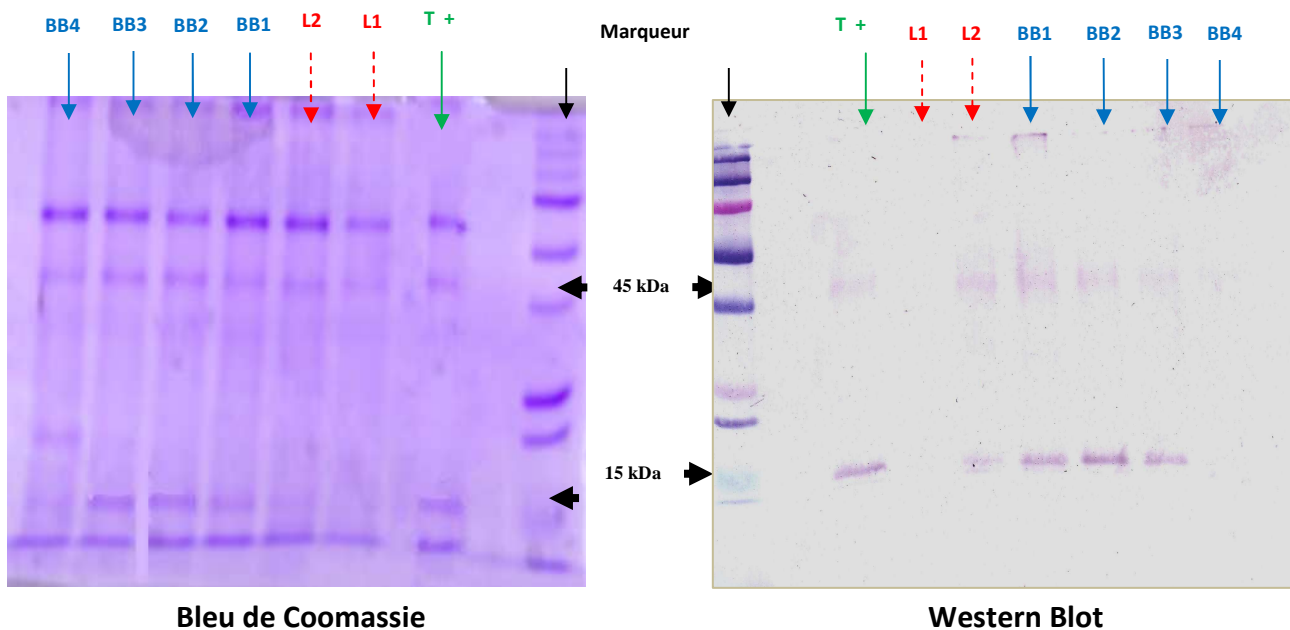
En revanche, huit jours après l'infestation (Figure 19), on remarque la présence de deux bandes supplémentaires dans le gel coloré au bleu de Coomassie : la première à 45 kDa environ qui apparaît chez tous les animaux, la seconde à 15 kDa environ qui apparaît uniquement chez trois Black Belly sur quatre et qui est absente chez les Lacaune. A cette même date, le western blot révèle deux bandes sensiblement aux mêmes poids moléculaires que précédemment chez trois Black Belly (BB1, BB2, BB3), le quatrième Black Belly (BB4) ne présentant aucune bande en western blot. Chez les Lacaune, L1 ne présente aucune bande tandis que L2 présente les deux bandes observées chez les trois premiers Black Belly même si la bande de 15 kDa semble moins prononcée. A  $J_{15}$  (voir annexes XII et XIII), le western blot révèle la présence des deux bandes chez tous les animaux des deux races. A  $J_{21}$  et  $J_{30}$  (voir annexes XII et XIII), les deux bandes révélées en western blot sont beaucoup moins nettes et s'estompent complètement chez certains animaux. A  $J_4$  (voir annexes XII et XIII), le western blot montre un très faible signal à 45 kDa chez tous les animaux.



**Figure 18.** Absence de la protéine Gal-15 dans le mucus d'animaux non infestés ( $J_0$ )

T + : Témoin positif (BB : 98006) ; L : Lacaune ; BB : Black Belly

L1: 93481 ; L2: 94242 ; BB1: 98021; BB2: 98060



**Figure 19.** Présence de la protéine Gal-15 dans le mucus d'animaux infestés et abattus à  $J_8$

L1: 92981 ; L2: 93071 ; BB1: 98053 ; BB2: 98006 ; BB3: 98017 ; BB4: 98097

## 4. Discussion

### 4.1. Protocole expérimental et méthodes utilisées

Le protocole expérimental a été mis en place afin, dans un premier temps, de comparer le degré d'installation et de développement du parasite *Haemonchus contortus* durant les trente premiers jours d'une primo-infestation entre des animaux d'une race résistante (Martinik Black Belly) et des animaux d'une race sensible (Lacaune). Puis, des paramètres physiopathologiques (hématologie, marqueur biochimique de l'inflammation et recrutement des éosinophiles dans la caillette) et la recherche de la protéine Gal-15 par western blot dans le mucus de la caillette des animaux sont venus compléter ces premières données parasitologiques. Dans cette étude, la priorité a été donnée à la cinétique de l'infestation parasitaire et des réponses de l'hôte. C'est en effet la première étude de ce type dans notre modèle race résistante / race sensible à *H. contortus* car dans les études précédentes (Terefe et *al.*, 2007b ; 2009), seules certaines dates étaient prises en compte rendant impossible toute vision globale sur le premier mois d'une primo-infestation. La priorité à la cinétique explique le nombre limité d'individus par date ( $J_0$ ,  $J_4$ ,  $J_8$ ,  $J_{15}$ ,  $J_{21}$  et  $J_{30}$ ) dans les deux races, ce qui a bien évidemment limité nos possibilités d'analyse statistique (utilisation de tests non paramétriques uniquement) notamment pour les comparaisons des données enregistrées *post-mortem*. Enfin, le petit noyau Martinik Black Belly de l'Unité expérimentale de la Sapinière du Département de Génétique Animale de l'INRA ne permet pas de fournir de gros effectifs d'agneaux de pères différents pour les expérimentations. En bilan, on a fait le pari de mettre en évidence des différences très nettes entre les deux races rendant ainsi interprétables des comparaisons entre lots de très petite taille.

### 4.2. Résultats

Les résultats de cette expérimentation indiquent que les agneaux de race Martinik Black Belly sont plus résistants à *H. contortus* que les agneaux de race Lacaune au cours d'une primo-infestation. Des différences très marquées de précocité et d'intensité d'excrétion d'œufs dans les matières fécales sont observées. Elles s'expliquent à la fois par un plus faible nombre de vers installés (Figure 13), un retard de développement (bien net à  $J_{21}$ , figure 14) et une taille réduite des vers femelles à  $J_{21}$  et à  $J_{30}$  (Tableau 5) chez les MBB en comparaison avec les Lacaune. Cette réduction de la taille des vers femelles chez des animaux résistants a déjà été retrouvée dans la race Martinik Black Belly (Terefe et *al.*, 2007b) ainsi que dans d'autres races ovines résistantes comme les moutons à poils des Canaries (Gonzalez et *al.*, 2008). Elle est une manifestation importante de l'immunité des ovins lors d'infestations par les strongles gastro-intestinaux (Stear et *al.*, 1999).

Les résultats des mesures hématologiques indiquent également des différences entre les animaux des deux races. Le taux d'hématocrite des MBB est significativement inférieur à celui des Lacaune avant infestation marquant d'emblée une différence entre ces deux races. Dans les deux races, l'infestation par *H. contortus* se traduit par une baisse de l'hématocrite dès J<sub>15</sub> soit au moment où le caractère hématophage de ce nématode est bien en place. Toutefois, la baisse de l'hématocrite est significativement plus importante ( $P < 0,05$ ) chez les Lacaune que chez les MBB d'après les observations réalisées entre J<sub>0</sub> à J<sub>21</sub>. En parallèle, on note une baisse significativement plus importante ( $P < 0,05$ ) du nombre total d'hématies par mm<sup>3</sup> et du taux d'hémoglobine chez les Lacaune que chez les MBB toujours sur cette même période (J<sub>0</sub> – J<sub>21</sub>). En conséquence, les différences de populations parasitaires entre les races se traduisent par un impact plus important sur les paramètres hématologiques des individus, les agneaux de race sensible montrant une anémie plus prononcée (Gonzalez et al., 2008). On a noté une élévation drastique du taux moyen de réticulocytes chez les Lacaune à J<sub>30</sub> ; toutefois, cette augmentation est due à un seul animal dont le taux passe de 0,3 à 2% entre J<sub>21</sub> et J<sub>30</sub> tandis que le second individu du groupe conserve des valeurs stables. Cette observation mériterait toutefois d'être approfondie sur un plus grand nombre d'animaux et sur une plus longue période d'observation car on peut supposer que les animaux qui subissent les plus lourdes pertes en hématies vont solliciter plus activement leur moelle osseuse pour compenser ces pertes.

L'infestation par *Haemonchus contortus* s'est traduite également par une augmentation du nombre d'éosinophiles circulants par mm<sup>3</sup> entre J<sub>0</sub> et J<sub>15</sub> dans les deux races mais à des degrés différents. Ce recrutement d'éosinophiles sanguins est particulièrement intense chez les agneaux de race résistante. Ce caractère avait déjà été retrouvé dans les études antérieures sur Black Belly (Terefe et al., 2007b ; 2009) mais également dans d'autres races résistantes européenne (Gonzalez et al., 2008) ou tropicale (Shakya et al., 2009). Une diminution du nombre d'éosinophiles sanguins est observée dans les deux races entre J<sub>15</sub> et J<sub>30</sub> mais elle est plus prononcée chez les agneaux de race sensible. L'apparition d'un grand nombre d'éosinophiles dans le sang est suivie par le recrutement de ces cellules dans la muqueuse abomasale parasitée. Dans la région du fundus, là où les larves 3 s'implantent avant de muer en larves 4, le recrutement semble plus précoce (J<sub>4</sub>) et plus intense (à J<sub>8</sub>) chez les Black Belly que chez les Lacaune. Ce résultat est particulièrement intéressant car il n'avait jamais été retrouvé dans les études antérieures (Terefe et al., 2007b ; 2009) ni dans d'autres modèles d'étude de la résistance dans lesquels les animaux sont abattus bien plus tard (Amarante et al., 2005). En bilan, les mécanismes assurant le recrutement de ces cellules dans la muqueuse semblent - au moins - plus précoces sinon plus performants chez les Black Belly que chez les Lacaune. Notre protocole ne permet pas d'expliquer cette différence mais il est possible de formuler un certain nombre d'hypothèses (Rothenberg et Hogan, 2006) : une production locale plus



importante d'IL-5 ou d'éotaxine chez les MBB assurant une plus grande chimiotaxie des éosinophiles vers les muqueuses parasitées, meilleure expression d'intégrines à la surface de l'éosinophile des MBB assurant un recrutement plus facile à partir des capillaires de la muqueuse ou bien production différente de facteurs inflammatoires comme les leucotriènes qui participent au recrutement local des éosinophiles... Dans la région pylorique, le recrutement des éosinophiles apparaît de façon retardée car les larves se développent dans un premier temps dans le fundus, région riche en glandes dans lesquelles s'effectuent les mues L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub>, tandis que les vers immatures migrent progressivement sur toute la surface de l'organe à partir de J<sub>8</sub>. Le comptage des éosinophiles dans la muqueuse montre également des valeurs légèrement plus élevées dans le pylore que dans les autres régions de la caillette (fundus et région intermédiaire). Terefe et *al.* (2009) ont trouvé des résultats similaires à J<sub>15</sub>. Compte tenu du faible nombre de larves utilisées dans les infestations expérimentales (une seule « dose » de 10 000 L<sub>3</sub>), il n'a pas été possible de retrouver des larves dans les coupes histologiques et l'interaction *in vivo* entre éosinophiles et parasites n'a pas pu être observée.

Le dosage du pepsinogène sanguin montre des élévations importantes dans les deux races dès J<sub>4</sub> pour les Black Belly avec un pic de J<sub>8</sub> à J<sub>15</sub> (figure 12) soit au moment où l'essentiel des vers a mué du stade 4 au stade immature et quitté les glandes de la caillette. Cette mesure est un reflet de l'intensité des lésions occasionnées par la présence de nématodes dans la région fundique de la caillette des ruminants (Dorny et Vercruysse, 1998), on peut donc considérer que ces lésions inflammatoires sont plus prononcées chez les Black Belly que chez les Lacaune à une même date (J<sub>8</sub> ou J<sub>15</sub>). Cette observation va dans le même sens que le comptage des éosinophiles dans la muqueuse : tout se passe comme si l'environnement de la caillette des Black Belly était plus hostile au parasite que celui des Lacaune. On peut envisager également que l'intensité supérieure des lésions de la muqueuse chez les MBB soit la conséquence d'un recrutement plus précoce et plus intense en éosinophiles, ces derniers libérant alors plus de médiateurs inflammatoires (radicaux libres et leucotriènes) toxiques pour les cellules de la muqueuse abomasale (Jacobsen et *al.*, 2007).

Un des résultats les plus importants de cette étude concerne la galectine-15. Dans une expérimentation précédente, l'expression du gène de la galectine 15 dans la muqueuse abomasale avait été comparée entre individus de race résistante (Black Belly) et individus de race sensible (Romane), huit jours post primo-infestation, à l'aide d'une technique de microarray (Puce d'expression 16K d'Agilent, spécifique de l'espèce ovine) et de RT-PCR (Jacquiet, données non publiées). Cette comparaison avait montré une expression plus importante de ce gène chez des MBB infestés que chez des Romane infestés. Aucune expression de ce gène n'avait été mise en évidence chez les animaux non infestés (MBB et Romane). Auparavant, la protéine n'avait été détectée que dans le mucus de moutons Merinos infestés expérimentalement par l'inoculation intra -

abomasale de  $10^6$  larves infestantes (Dunphy et *al.*, 2000). C'est la première fois que l'on démontre la présence de la protéine Galectine -15 dans le mucus d'animaux de notre modèle (MBB/ Lacaune) lors d'une primoinfestation. Cette étude confirme que la production de cette protéine est induite par l'infestation par le nématode car les Western Blots à J<sub>0</sub> ne montrent aucun signal. L'induction est progressive, la présence de la protéine est bien établie à J<sub>8</sub> et à J<sub>15</sub> mais semble diminuer de J<sub>21</sub> à J<sub>30</sub>. A J<sub>8</sub>, un agneau Black Belly (sur 4) et un agneau Lacaune sur deux ne présentent aucune bande spécifique pour la Galectine – 15 soulignant ainsi l'existence de variations individuelles. A J<sub>15</sub>, tous les agneaux (MBB comme Lacaune) présentent des bandes spécifiques de Gal-15 en western blot. L'intensité des bandes en western blot est plus importante chez les MBB que chez les Lacaune à J<sub>8</sub> et à J<sub>15</sub> suggérant que la protéine pourrait être produite en plus grande quantité chez les animaux de race résistante, résultat qui serait en accord avec les données d'expression du gène. On sait grâce aux données du modèle Mérinos que la galectine-15 est sécrétée en grandes quantités dans le mucus des animaux infestés (Dunphy et *al.*, 2000), c'est pourquoi, il est vraisemblable que les bandes à 15 et 45 kDa que l'on observe au bleu de Coomassie soient constituées de Gal-15. La bande à 45 kDa pourrait être un polymère (trimère) de galectine 15 sachant que les conditions de l'électrophorèse étaient non dénaturantes. On sait que le mucus de moutons immunisés contre les strongles gastro-intestinaux contient des facteurs affectant la mobilité des larves et participant à leur expulsion (Harrison et *al.*, 1999) mais ces facteurs n'ont jamais été clairement identifiés. Selon Young et Meeusen (2004), il pourrait s'agir de lectines (comme la galectine-15) qui se fixeraient sur les résidus  $\beta$ -galactose de l'épicuticule des larves de nématodes (Sato et *al.*, 2009), les entourant d'un véritable ciment avant leur expulsion. Toutefois, la prudence reste de mise car nous n'avons pas démontré dans cette étude l'implication formelle de la galectine-15 dans la résistance des moutons Black Belly à *H. contortus*.

## Conclusions et perspectives

C'est la première fois que la présence de la protéine Gal-15 est démontrée par western blot dans le mucus abomasal de moutons Martinik Black Belly et Lacaune primo-infestés par le nématode hématophage, *Haemonchus contortus*. Il conviendrait d'extraire les protéines à 15 et 45 kDa des gels de polyacrylamide afin de séquencer leurs parties N-terminales et s'assurer ainsi définitivement de leur identité comme Galectine-15. De plus, il serait intéressant de réaliser les électrophorèses en conditions dénaturantes afin de vérifier si les polymères de 45 kDa sont bien tous réduits à 15 kDa.

Il apparaît également indispensable de réaliser la cinétique de l'expression du gène de la galectine -15 dans la muqueuse de ces animaux de J<sub>0</sub> à J<sub>30</sub> en RT-PCR. Initialement, cette étape faisait partie du projet de Master 2 mais faute de temps, cela n'a pas été possible. Enfin, il nous semble intéressant de réaliser des tests fonctionnels de migration larvaire avec les mucus des différents animaux. En effet, il est possible d'évaluer facilement les capacités de migration des larves infestantes d'*H. contortus* dans différentes conditions. L'objectif de cette étude serait de comparer les capacités de migration de larves mises en contact avec du mucus d'un animal riche en galectin-15 avec celles de larves mises en contact avec un mucus sans Gal-15. Enfin, l'expression de cette protéine Gal-15 étant concomitante du recrutement d'éosinophiles dans la muqueuse abomasale, il paraît important d'étudier les interactions Gal-15 et éosinophiles.

# Références bibliographiques

AMARANTE A.F.T., BRICARELLO P.A., HUNTLEY J.F., MAZZOLIN L.P., GOMES J.C. (2005). Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin-A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Veterinary Parasitology*, 128: 99-107.

ANTHONY R.M., RUTITZKY L.I., URBAN J.F., STADECKER M.J., GAUSE W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Review Immunology*, 7(12) : 975-987.

ARTIS D. (2006). New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastro-intestinal nematodes. *International Journal for Parasitology*, 36(6): 723-733.

AUTEF P. (2006). L'haemonchose ovine. *Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires (SNGTV)*. Fiche n° 108.

BALIC A., CUNNINGHAM C.P., MEEUSEN E.N.T. (2006). Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunology*, 28: 107-115.

BASSET, C., HOLTON, J., O'MAHONY, R., ROITT, I. (2003). Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine 21 Suppl 2*, S12-23.

BEHM, C.A. et OVINGTON, K.S. (2000). The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitology Today* 16, 202-209

BENE, M.C., FAURE, G.C. (2000). Immunité innée et cognitive aux interfaces muqueuses. *Revue française des laboratoires* 327, 49-55.

BISHOP S.C. et MORRIS C.A. (2007). Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small ruminant research*, 48-59.

BOWMAN D.D. (1999). Georgis'Parasitology for Veterinarians. 7<sup>e</sup> edition. Philadelphia: W. B. Saunders company. 414 p.

BRARD C., et CHARTIER C.(1997). Quand suspecter une strongylose digestive chez les ovins et les caprins et conduite à tenir. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial Parasitologie des ruminants*, 1997, 28 : 1865-1870.

BRUNET S. (2008). Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants. *Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse*

BUSSIERAS J. et CHERMETTE R. (1991). Abrégé de Parasitologie vétérinaire – Helminthologie – Fascicule IV Informations techniques de services vétérinaires. *Service de parasitologie de l'ENV de Maisons-Alfort*.

BUSSIERAS J. et CHERMETTE R. (1995). Helminthologie vétérinaire (Fasc. III). 2nd ed. *Service de parasitologie de l'ENV de Maisons-Alfort*, 299 p.

CABARET, J. (2004). Parasitisme helminthique en élevage biologique ovin : *réalités et moyens de contrôle*. INRA Productions Animales 17.

CABARET J., MAGE C., BOUILHOL M. (2002). Helminth intensity and diversity in organic meat sheep farms in centre of France. *Veterinary Parasitology*, 105 (1): 33-47

CHARTIER C., ITARD J., MOREL P.C., TRONCY P.M. (2000). Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. *Ed. Tec & Doc*, Paris, 774p.

COOP R.L. et HOLMES P.H. (1996). Nutrition and parasite interaction. *International Journal for Parasitology*, 26(8-9): 951-962.

CRAIG N.M., MILLER H.R.P., SMITH W.D., KNIGHT P.A. (2007). Cytokine expression in naïve and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120(1-2): 47-54.

DELTOUR A., P. (2000). Etude du parasitisme digestif des bovins et du porc dans le Guangxi, Chine : *Enquête coproscopique réalisée en 1998*. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*. ENVA.

DE VEER M.J., KEMP J.M., MEEUSEN E.N.T. (2007). The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*, 29: 1-9.

DOENHOFF M.J. (2000). The immune system. **In**: AXFORD R.F.E., BISHOP S.C., NICHOLAS F.N., OWEN J.B. Breeding for disease resistance in farm animals, 2<sup>nd</sup> Edition Wallingford, UK: CAB international, 47-65

DOKNY P. et VERCRUYSSSE J. (1998). Evaluation of a micro method for the routine pepsinogen in cattle. *Research in Veterinary Science*, 65, 259-262

DUNPHY J.L., BALIC A., BARCHAM G.J., HORVATH A.J., NASH A.D., MEEUSEN E.N.T. (2000). Isolation and characterization of a novel inducible Mammalian Galectin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(41): 32106-32113.

DURETTE-DESSET, M.C. et CHABAUD, A.G. (1993). Nomenclature of Strongylidae above the family group. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 68, 111-112.

FABRE V. BEITING D.P., BLISS S.K., GEBRESELASSIE N.G., GAGLIARDO L.F., LEE N.A., LEE J.J. APPLETON J.A. (2009). Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *Journal of Immunology*, 182: 1577-1583.

FINKELMAN, F.D., SHEA-DONOHUE, T., GOLDHILL, J., SULLIVAN, C.A., MORRIS, S.C., MADDEN, K.B., GAUSE, W.C., URBAN, J.F., JR. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: *lessons from studies with rodent models*. *Annual Review of Immunology*, 15: 505-533.

GOLDSBY, R.A., KINDT, T.J., OSBORNE, B.A. (2003). Immunologie - Le cours de Janis Kuby. *Dunod, Paris*, 660 p.

GONZALEZ J.F., HERNANDEZ A., MOLINA J.M., FERNANDEZ A., RAADSMA H.W., MEEUSEN E.N.T., PIEDRAFITA D. (2008). Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4): 374-378.

GRUNER, L., AUMONT, G., GETACHEW, T., BRUNEL, J.C., PERY, C., COGNIE, Y., GUERIN, Y. (2003). Experimental infection of Black Belly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Veterinary Parasitology* 116, 239-249.

HARRISON G.B., PULFORD H.D., GATEHOUSE T.K., SHAW R.J., PFEFFER A., SHOEMAKER C.B. (1999). Studies on the role of mucus and mucosal hypersensitivity reactions during rejection of *Trichostrongylus colubriformis* from the intestine of immune sheep using an experimental challenge model. *International Journal for Parasitology*, 29: 459-468.

HECKENDORN, F. (2007). The control of gastrointestinal sheep nematodes with tanniferous forage plants. *Swiss Federal Institute of Technology*, Zurich, Suisse.

HOSTE H. et CHARTIER C. (1997). Perspectives de lutte contre les strongyloses gastro-intestinales des ruminants domestiques. *Le Point Vétérinaire, Numéro spécial parasitologie des ruminants*, 28 : 1963-1969 (p.181-187)

HOSTE, H., HUBY, F. ET MALLET, S. (1997). Strongyloses gastro-intestinales des ruminants : conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Le Point Vétérinaire, Numéro spécial parasitologie des ruminants*, 28, 53-59.

HOSTE, H., PAOLINI, V., PARAUD, C. ET CHARTIER, C. (2004). Gestion non-chimique du parasitisme par les nématodes chez les petits ruminants. *Bulletin G.T.V. (Hors série Parasitologie des ruminants laitiers)*, 131-135.

JACQUIET P., BARILLET F., BOUIX J., FRANCOIS D., MORENO C. et TEREFE G. (2009). La résistance génétique des ovins aux strongles gastro-intestinaux. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire*, France, Tome 162 - N°1.

JACOBSEN E.A., TARANOVA A.G., LEE N.A., Lee J.J. (2007). Eosinophils: *singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation?* *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(6): 1313-1320.

JANEWAY, C.A., JR. (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 98: 7461-7468.

KELSALL B.L. (2008). Innate and adaptive mechanisms to control of pathological intestinal inflammation. *Journal of Pathology*, 214: 242-259.

LACROUX C. (2006). Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) dans deux races ovines, INRA 401 et Barbados Black Belly. *Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse*.

LACROUX C., NGUYEN T.H., ANDREOLETTI O., PREVOT F., GRISEZ C., BERGEAUD J.P., GRUNER L., BRUNEL J.C., FRANCOIS D., DORCHIES P., JACQUIET P. (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research*, 37(4): 607-622.



LOUVANDINI H., VELOSO C.F., PALUDO G.R., DELL'PORTO A., GENNARI S.M., McMANUS C.M. (2006). Influence of protein supplementation in the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry season. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2): 103-11

MAGE C. (1991). L'haemonchose ovine: *actualités épidémiologique, thérapeutique et préventive*. *Bulletin des GTV*, 98 (3): 75-89.

MAHIEU, M., AUMONT, G., ALEXANDRE, G., (1997). Elevage intensif des ovins tropicaux à la Martinique. *INRA. Productions Animales* 10, 21-32.

MEEUSEN, E.N.T.AND BALIC, A. (2000). Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?. *Parasitology Today* 16, 95-101.

NAVES, M., ALEXANDRE, G., LEIMBACHER, F., MANDONNET, N., MENENDEZ-BUXADERA, A., (2001). Les ruminants domestiques de la Caraïbe : *le point sur les ressources génétiques et leur exploitation*. *INRA. Productions Animales* 14, 181-192.

PAOLINI, V. (2004). Effets des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre. *Thèse de l'Université de Perpignan*, Perpignan.

PENICAUD J. (2007). Comparaison de la réponse anticorps systémique des ovins Barbados Black Belly et INRA 401 lors d'infestations expérimentales par *Haemonchus contortus* (Nematoda : Trichostrongylidae). *Thèse de Doctorat Vétérinaire*. ENVt.

PERNTHANER A., COLE S.A., MORRISON L., HEIN W.R. (2005). Increased expression of Il-5, Il-13 and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infection and Immunity*, 73: 2175-2183.

RAYNAUD J.P. (1970). Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie (Paris)* 45, n°3, pp 321-342.

ROTHENBERG M.E., HOGAN S.P. (2006). The eosinophil. *Annual Review of Immunology*, 24: 147-174.

SANSONETTI, P.J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews of Immunology*, 4: 953-964.

SATO S., SAINT-PIERRE C., BHAUMIK P., NIEMINEN J. (2009). Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble  $\beta$ -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological Reviews*, 230: 172-187.

SHAKYA K.P., MILLER J.E., HOROHOV D.W. (2009). A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Veterinary Parasitology*, 163(1-2): 57-66.

STEAR M.J., STRAIN S., BISHOP S.C. (1999). Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *International Journal for Parasitology*, 29: 51-56.

TEREFE G.M. (2007). Rôle des éosinophiles dans la régulation des populations d'*Haemonchus contortus* chez le mouton. *Thèse d'état. Institut National Polytechnique de Toulouse*.

TEREFE G., GRISEZ C., PREVOT F., BERGEAUD J.P., DORCHIES P., BRUNEL J.C., FRANCOIS D., FOURQUEAUX I., JACQUIET P. (2007a). In vitro pre-exposure of *Haemonchus contortus* L3 to blood eosinophils reduces their establishment potential in sheep. *Veterinary Research*, 38(4):647-54.

TEREFE G., LACROUX C., ANDREOLETTI O., GRISEZ C., PREVOT F., BERGEAUD J.P., PENICAUD J., ROUILLON V., GRUNER L., BRUNEL J.C., FRANCOIS D., BOUIX J., DORCHIES P., JACQUIET P. (2007b). Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunology*, 29(8):415-24.

TEREFE G., NGUYEN K.C., JACQUIET P., BERGEAUD J.P., GRISEZ C., PREVOT F., BRUNEL J.C., DORCHIES PH. (2007c). Daily sodium cromoglycate treatment decreased mast cell and blood eosinophilic responses in *Haemonchus contortus* resistant Black Belly sheep. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2007, **158**, 02,82-85.

TEREFE G., LACROUX C., PREVOT F., GRISEZ C., BERGEAUD J.P., BLEUART C., DORCHIES P., FOUCRAS G., JACQUIET P. (2009). Eosinophils in *Haemonchus contortus* – infected resistant and susceptible breeds of sheep: Abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. *Veterinary Parasitology*, 165: 161-164.

TOSI, M.F. (2005). Innate immune responses to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116: 241-249.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J.L., DUNN, A.M., JENNINGS, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology*, 2nd Ed. Blackwell Science .pp 19-164.

VASTA G.R. (2009). Roles of galectins in infection. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 424-438.

YOUNG A.R., MEEUSEN E.N.T. (2004). Galectins in parasitic infection and allergic inflammation. *Glycoconjugate Journal*, 19: 601-606.

**Sites d'internet consultés:**

[agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf\\_ovin1004note.pdf](http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_ovin1004note.pdf)

# Annexes

# Annexe I

## Charge parasitaire (*H. contortus*)

	Date abattage	Race	N° animal	earlyL4	lateL4	Imm mâle	Imm femelle	Mâle	Femelle	Total
Contenu	<b>J<sub>0</sub></b>	L	93481	0	0	0	0	0	0	0
Digestion				0	0	0	0	0	0	0
Total				0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
Contenu	<b>J<sub>0</sub></b>	L	94242	0	0	0	0	0	0	0
Digestion				0	0	0	0	0	0	0
Total				0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
Contenu	<b>J<sub>0</sub></b>	BBB	98060	0	0	0	0	0	0	0
Digestion				0	0	0	0	0	0	0
Total				0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
Contenu	<b>J<sub>0</sub></b>	BBB	98021	0	0	0	0	0	0	0
Digestion				0	0	0	0	0	0	0
Total				0	0	0	0	0	0	<b>0</b>

Contenu	<b>J<sub>4</sub></b>	L	91181	0	200	0	0	0	0	200
Digestion				0	90	0	0	0	0	90
Total				0	290	0	0	0	0	<b>290</b>
Contenu	<b>J<sub>4</sub></b>	L	91381	0	1100	0	0	0	0	1100
Digestion				0	560	0	0	0	0	560
Total				0	1660	0	0	0	0	<b>1660</b>
Contenu	<b>J<sub>4</sub></b>	BBB	98013	0	90	0	0	0	0	90
Digestion				0	70	0	0	0	0	70
Total				0	160	0	0	0	0	<b>160</b>
Contenu	<b>J<sub>4</sub></b>	BBB	98111	0	660	0	0	0	0	660
Digestion				0	350	0	0	0	0	350
Total				0	1010	0	0	0	0	<b>1010</b>

Contenu	<b>J<sub>8</sub></b>	L	93071	20	2360	20	1540	0	0	3940
Digestion				0	70	0	10	0	0	80
Total				90	2450	20	1550	0	0	<b>4020</b>
Contenu	<b>J<sub>8</sub></b>	L	92981	80	1070	30	820	0	0	2000
Digestion				40	80	0	0	0	0	120
Total				120	1150	0	0	0	0	<b>2120</b>
Contenu	<b>J<sub>8</sub></b>	BBB	98017	0	980	0	570	0	0	1550
Digestion				10	155	0	20	0	0	185
Total				10	1135	0	590	0	0	<b>1735</b>
Contenu	<b>J<sub>8</sub></b>	BBB	98006	110	360	0	100	0	0	570
Digestion				50	120	10	0	0	0	180
Total				160	480	10	100	0	0	<b>750</b>
Contenu	<b>J<sub>8</sub></b>	BBB	98097	80	1460	10	700	0	0	2250
Digestion				50	70	0	0	0	0	120
Total				130	1530	10	700	0	0	<b>2370</b>
Contenu	<b>J<sub>8</sub></b>	BBB	98053	20	70	0	0	0	0	90
Digestion				10	0	0	0	0	0	10
Total				30	70	0	0	0	0	<b>100</b>

Contenu	J <sub>15</sub>	L	92441	0	270	760	1120	30	0	2180
Digestion				0	80	110	195	10	0	395
Total				0	350	870	1315	40	0	<b>1575</b>
Contenu	J <sub>15</sub>	L	91071	0	320	580	1040	40	0	1980
Digestion				0	130	140	240	0	0	510
Total				0	450	720	1280	40	0	<b>2490</b>
Contenu	J <sub>15</sub>	BBB	98075	0	190	140	250	60	0	640
Digestion				0	90	170	120	20	0	400
Total				0	280	310	370	80	0	<b>1040</b>
Contenu	J <sub>15</sub>	BBB	98010	0	190	590	760	10	0	1550
Digestion				0	10	10	50	0	0	70
Total				0	200	600	810	10	0	<b>1620</b>
Contenu	J <sub>15</sub>	BBB	98005	0	100	500	490	0	0	1090
Digestion				0	100	220	300	0	0	620
Total				0	200	720	790	0	0	<b>1710</b>

Contenu	J <sub>21</sub>	L	93482	0	30	30	110	930	1190	2290
Digestion				0	0	0	30	900	670	1600
Total				0	30	30	140	1830	1860	<b>3890</b>
Contenu	J <sub>21</sub>	L	91741	0	0	20	170	1570	1380	3140
Digestion				0	0	0	10	630	690	1330
Total				0	0	20	180	2200	2070	<b>4470</b>
Contenu	J <sub>21</sub>	BBB	98102	0	0	70	180	140	10	400
Digestion				0	0	10	70	40	20	140
Total				0	0	80	250	180	30	<b>540</b>
Contenu	J <sub>21</sub>	BBB	98064	10	0	20	460	380	10	880
Digestion				0	0	10	90	30	0	130
Total				10	0	30	550	410	10	<b>1010</b>

Contenu	J <sub>30</sub>	L	91611	0	0	0	0	510	770	1280
Digestion				0	0	0	0	10	20	30
Total				0	0	0	0	520	790	<b>1310</b>
Contenu	J <sub>30</sub>	L	91182	0	0	30	30	1710	2120	3890
Digestion				0	0	0	10	560	650	1220
Total				0	0	30	40	2270	2770	<b>5110</b>
Contenu	J <sub>30</sub>	BBB	98012	0	0	0	90	150	140	380
Digestion				0	0	0	0	130	140	270
Total				0	0	0	90	280	280	<b>650</b>
Contenu	J <sub>30</sub>	BBB	98089	0	0	0	0	20	70	90
Digestion				0	0	0	0	20	50	70
Total				0	0	0	0	40	120	<b>160</b>
Contenu	J <sub>30</sub>	BBB	98009	0	0	0	0	70	170	240
Digestion				0	0	0	0	40	70	110
Total				0	0	0	0	110	240	<b>350</b>

## Annexe II : Taille des Femelles d'*H. contortus* à J<sub>21</sub> et J<sub>30</sub>

J <sub>21</sub> Race : Lac N° : 91741		J <sub>21</sub> Race : BB N° : 98101		J <sub>21</sub> Race : BB N° : 98064		J <sub>21</sub> Race : Lac N° : 93482		J <sub>30</sub> Race : Lac N° : 91181		J <sub>30</sub> Race : BB N° : 98012		J <sub>30</sub> Race : BB N° : 98089		J <sub>30</sub> Race : BB N° : 98009		J <sub>30</sub> Race : Lac N° : 91611	
N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)	N°	Taille (mm)
1	9	1	10	1	-	1	12	1	20	1	13	1	12	1	17	1	19
2	11	2	11	2	13	2	11	2	22	2	13	2	11	2	15	2	15
3	14	3	8	3	12	3	13	3	23	3	12	3	15	3	13	3	17
4	14	4	12	4	10	4	16	4	22	4	13	4	10	4	13	4	18
5	18	5	10	5	14	5	15	5	24	5	14	5	17	5	15	5	16
6	17	6	12	6	8	6	13	6	24	6	11	6	14	6	14	6	18
7	12	7	7	7	12	7	12	7	14	7	13	7	15	7	15	7	17
8	10	8	11	8	12	8	12	8	19	8	7	8	14	8	-	8	18
9	12	9	11	9	13	9	13	9	17	9	15	9	8	9	13	9	19
10	14	10	7	10	12	10	13	10	21	10	12	10	7	10	13	10	20
11	13	11	8	11	12	11	14	11	22	11	9	11	-	11	15	11	-
12	15	12	11	12	8	12	17	12	18	12	12	12	13	12	15	12	17
13	11	13	10	13	12	13	13	13	22	13	12	Moy=12.36 Ecart= 3.11		13	19	13	-
14	11	14	-	14	13	14	15	14	20	14	18			14	11	14	22
15	19	15	6	15	10	15	14	15	18	Moy=12.43 Ecart=2.56				15	17	15	17
16	17	16	12	16	11	16	-	16	20					16	10	16	18
17	14	17	10	17	7	17	14	17	19					Moy=14.33 Ecart=2.32		17	16
18	17	18	9	18	12	18	17	18	20							18	18
19	19	Moy=9.70 Ecart=1.90		19	12	19	15	19	22							19	17
20	16			20	11	20	15	20	18							20	19
21	12			21	12	21	17	21	22							21	17
22	19			22	10	22	13	22	22							22	17
23	17			23	12	23	16	23	21							23	20
24	12			24	13	24	13	Moy=20.43 Ecart=2.39								24	13
25	13			25	10	25	-									25	21
26	18			26	13	26	14									26	18
27	15			27	11	27	13			27	17						
28	-	28	14	28	-	28	16										
29	13	29	9	29	15	29	18										
30	14	30	12	30	13	30	22										
31	16	31	13	31	17	Moy=17.86 Ecart=1.98											
32	18	32	11	32	15												
33	15	33	12	33	14												
Moy=14.53 Ecart=2.83		34	12	34	13												
		35	13	35	14												
		36	11	Moy=14.09 Ecart=1.61													
		37	-														
		38	10														
				Moy=11.44 Ecart=1.65													

## Annexe III

### Comptage des œufs dans les matières fécales (OPG)

Lacaune									
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>18</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>23</sub>	J <sub>26</sub>	J <sub>30</sub>
93481	0								
94242	0								
91181	0	0							
91381	0	0							
92981	0		0						
93071	0		0						
91071	0			0					
92441	0			0					
91741	0				0	500			
93482	0				0	300			
91611	0				0	0	250	1050	2250
91182	0				350	1750	3850	5350	6750
Moyenne	0,00	0,00	0,00	0,00	87,50	637,50	2050,00	3200,00	4500,00
Ecart type	0,00	0,00	0,00	0,00	175,00	769,60	2545,58	3040,56	2250,00

MBB									
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>18</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>23</sub>	J <sub>26</sub>	J <sub>30</sub>
98060	0								
98021	0								
98111	0	0							
98013	0	0							
98097	0		0						
98017	0		0						
98053	0		0						
98006	0		0						
98075	0			0					
98010	0			0					
98005	0			0					
98102	0				0	0			
98064	0				0	0			
98089	0				0	0	0	150	600
98009	0				0	0	100	250	200
98012	0				0	0	0	0	0
Moyenne	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	133,33	266,67
Ecart type	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,74	125,83	305,51



## Annexe IV

### Cinétique de l'éosinophilie sanguine ( $10^3/\mu\text{L}$ )

Lacaune						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
91 611	0,05	0,06	0,16	0,51	0,06	0,01
91 182	0,19	0,09	0,19	0,20	0,05	0,06
91 741	0,14	0,07	0,26	0,13	0,09	
93 482	0,80	0,56	0,56	0,22	0,07	
91 071	0,15	0,64	0,58	0,31		
92 441	0,02	0,10	0,23	0,22		
92 981	0,07	0,06	0,09			
93 071	0,02	0,06	0,28			
91 181	0,16	0,08				
91 381	0,07	0,09				
93 481	0,08					
94 242	0,02					
Moyenne	0,15	0,18	0,29	0,27	0,07	0,04
Ecart type	0,21	0,22	0,18	0,13	0,02	0,04

MBB						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
98 089	0,07	0,16	0,45	0,64	0,49	0,40
98 009	0,41	0,29	0,57	0,46	0,60	0,41
98 012	0,35	0,39	0,59	0,48	0,26	0,19
98 064	0,20	0,23	1,14	1,50	0,52	
98 102	0,12	0,19	0,60	1,17	0,23	
98 075	0,07	0,13	0,33	0,34		
98 010	0,25	0,88	1,43	1,19		
98 005	0,19	0,17	0,74	0,77		
98 006	0,04	0,17	0,22			
98 053	0,11	0,50	0,50			
98 097	0,43	0,44	0,80			
98 017	0,08	0,05	0,28			
98 013	0,11	0,17				
98 111	0,29	0,48				
98 060	0,09					
98 021	0,12					
Moyenne	0,18	0,30	0,64	0,82	0,42	0,33
Ecart type	0,13	0,22	0,35	0,42	0,17	0,12

## Annexe V

### Cinétique du nombre total d'hématies ( $10^6/\mu\text{L}$ )

Lacaune						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
91 611	11,04	11,37	10,81	10,56	9,83	8,82
91 182	12,20	11,19	12,10	10,31	7,77	6,82
91 741	12,09	11,24	11,77	9,58	8,03	
93 482	13,11	11,21	13,14	10,28	8,90	
91 071	14,25	12,74	13,09	11,42		
92 441	13,69	13,66	13,17	11,85		
92 981	11,91	12,92	11,86			
93 071	11,60	13,17	12,30			
91 181	12,00	9,04				
91 381	12,23	10,82				
93 481	9,80					
94 242	11,28					
Moyenne	12,10	11,74	12,28	10,67	8,63	7,82
Ecart type	1,19	1,38	0,83	0,83	0,93	1,41

MBB						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
98 089	9,84	9,94	9,33	7,96	8,73	8,01
98 009	8,95	9,52	10,05	9,11	9,31	9,42
98 012	11,88	11,96	12,31	11,56	11,30	10,32
98 064	11,56	10,38	11,45	10,03	9,41	
98 102	12,91	12,20	12,42	11,47	11,02	
98 075	12,68	12,28	12,11	11,18		
98 010	12,18	11,16	11,85	10,31		
98 005	10,98	10,27	11,04	9,25		
98 006	12,42	12,79	11,71			
98 053	10,63	11,29	11,01			
98 097	12,94	12,56	12,40			
98 017	8,70	9,17	9,14			
98 013	11,37	11,90				
98 111	12,20	11,78				
98 060	11,87					
98 021	12,20					
Moyenne	11,46	11,23	11,16	10,11	9,95	9,25
Ecart type	1,32	1,18	1,18	1,28	1,14	1,16

## Annexe VI

### Cinétique des mesures d'hématocrite (%)

Lacaune						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
91 611	34,70	36,20	34,90	33,20	32,10	29,10
91 182	36,80	34,20	36,60	31,30	26,00	26,50
91 741	40,00	35,90	37,10	32,70	28,40	
93 482	42,10	36,10	42,00	34,20	31,50	
91 071	34,00	30,00	30,00	27,10		
92 441	45,00	43,70	41,60	39,10		
92 981	36,80	39,10	36,80			
93 071	31,10	35,10	33,20			
91 181	33,90	26,60				
91 381	38,60	34,70				
93 481	32,70					
94 242	36,60					
Moyenne	36,86	35,16	36,53	32,93	29,50	27,80
Ecart type	4,03	4,62	4,01	3,91	2,84	1,84

MBB						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
98 089	30,80	31,60	29,70	25,90	29,20	27,30
98 009	22,40	23,50	24,70	22,80	23,60	24,20
98 012	29,40	29,90	30,60	28,90	28,60	27,10
98 064	35,70	32,00	35,60	32,10	30,80	
98 102	34,90	33,50	33,30	31,30	31,00	
98 075	35,10	33,60	33,10	30,90		
98 010	32,50	29,50	31,40	28,10		
98 005	28,80	27,00	28,70	24,70		
98 006	30,20	30,80	28,50			
98 053	30,20	31,70	31,20			
98 097	34,30	33,20	32,30			
98 017	30,30	31,80	32,00			
98 013	28,10	29,80				
98 111	34,80	33,70				
98 060	33,10					
98 021	36,20					
Moyenne	31,68	30,83	30,93	28,09	28,64	26,20
Ecart type	3,63	2,83	2,81	3,36	3,00	1,73

## Annexe VII : Cinétique de l'hémoglobinémie (g/dL)

Lacaune						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
91 611	12,00	12,20	11,50	11,10	10,50	9,50
91 182	13,00	11,70	12,90	10,90	8,30	8,10
91 741	12,90	12,10	12,70	10,40	8,70	
93 482	13,90	11,80	14,20	11,10	9,70	
91 071	14,80	13,50	13,70	11,90		
92 441	14,60	14,80	14,30	12,90		
92 981	12,00	13,10	12,10			
93 071	10,80	12,70	11,50			
91 181	12,50	9,30				
91 381	13,40	11,70				
93 481	9,80					
94 242	10,90					
Moyenne	12,55	12,29	12,86	11,38	9,30	8,80
Ecart type	1,54	1,43	1,13	0,89	0,99	0,99

MBB						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
98 089	10,80	11,10	10,20	8,90	10,00	9,20
98 009	9,40	10,00	10,40	9,40	9,80	9,90
98 012	12,70	12,70	13,30	12,50	12,30	11,00
98 064	12,60	11,20	12,60	10,90	10,70	
98 102	13,40	12,90	13,00	12,10	11,70	
98 075	13,30	12,80	12,50	11,50		
98 010	13,70	12,40	13,30	11,50		
98 005	11,50	10,70	11,60	9,50		
98 006	12,60	13,10	11,80			
98 053	10,90	11,80	11,60			
98 097	13,50	13,00	13,00			
98 017	10,10	10,60	10,90			
98 013	11,60	12,30				
98 111	12,80	12,50				
98 060	12,80					
98 021	13,50					
Moyenne	12,20	11,94	12,02	10,79	10,90	10,03
Ecart type	1,32	1,03	1,10	1,35	1,08	0,91

## Annexe VIII : Cinétique du taux de réticulocytes (%)

Lacaune						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
91 611	0,12	0,09	0,12	0,10	0,11	0,13
91 182	0,06	0,04	0,11	0,06	0,30	2,00
91 741	0,07	0,12	0,11	0,13	0,36	
93 482	0,14	0,13	0,11	0,11	0,64	
91 071	0,08	0,09	0,09	0,09		
92 441	0,13	0,11	0,09	0,08		
92 981	0,04	0,07	0,06			
93 071	0,09	0,09	0,12			
91 181	0,07	0,07				
91 381	0,08	0,08				
93 481	0,11					
94 242	0,07					
Moyenne	0,09	0,09	0,10	0,10	0,35	1,07
Ecart type	0,03	0,03	0,02	0,02	0,22	1,32

MBB						
N° animal	J <sub>0</sub>	J <sub>4</sub>	J <sub>8</sub>	J <sub>15</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>30</sub>
98 089	0,59	0,79	0,69	0,53	0,63	0,66
98 009	0,12	0,14	0,09	0,12	0,08	0,12
98 012	0,15	0,21	0,16	0,20	0,12	0,21
98 064	0,34	0,36	0,36	0,40	0,62	
98 102	0,08	0,06	0,07	0,12	0,18	
98 075	0,09	0,10	0,11	0,13		
98 010	0,09	0,12	0,08	0,09		
98 005	0,09	0,06	0,05	0,08		
98 006	0,77	0,62	0,59			
98 053	0,11	0,11	0,13			
98 097	0,55	0,44	0,62			
98 017	0,20	0,15	0,32			
98 013	0,17	0,12				
98 111	0,20	0,25				
98 060	0,12					
98 021	0,51					
Moyenne	0,26	0,25	0,27	0,21	0,33	0,33
Ecart type	0,22	0,22	0,24	0,17	0,28	0,29

## Annexe IX

### Dosage des protéines dans le mucus de raclage (µg/mL)

Date	LACAUNE	
	N° animal	[µg/mL]
<b>J<sub>0</sub></b>	<b>93 481</b>	484
	<b>94 242</b>	461
<b>J<sub>4</sub></b>	<b>91 181</b>	494
	<b>91 381</b>	525
<b>J<sub>8</sub></b>	<b>92 981</b>	902
	<b>93 071</b>	589
<b>J<sub>15</sub></b>	<b>91 071</b>	471
	<b>92 441</b>	615
<b>J<sub>21</sub></b>	<b>93 482</b>	493
	<b>91 741</b>	532
<b>J<sub>30</sub></b>	<b>91 611</b>	491
	<b>91 182</b>	436

Date	MBB	
	N° animal	[µg/mL]
<b>J<sub>0</sub></b>	<b>98 021</b>	466
	<b>98 060</b>	395
<b>J<sub>4</sub></b>	<b>98 013</b>	408
	<b>98 111</b>	538
<b>J<sub>8</sub></b>	<b>98 053</b>	1237
	<b>98 006</b>	708
	<b>98 017</b>	677
	<b>98 097</b>	692
<b>J<sub>15</sub></b>	<b>98 075</b>	649
	<b>98 010</b>	489
	<b>98 005</b>	561
<b>J<sub>21</sub></b>	<b>98 102</b>	534
	<b>98 064</b>	463
<b>J<sub>30</sub></b>	<b>98 089</b>	572
	<b>98 009</b>	615
	<b>98 012</b>	546

# **Annexe X**

## **Comptage des éosinophiles**

Date	Race	Animal	Total sur 5 champs (Fundus)			Total sur 5 champs (Intermédiaire)			Total sur 5 champs (Pylore)		
			S/muqueuse	Lamina propria	Intra-épithéliale	S/muqueuse	Lamina propria	Intra-épithéliale	S/muqueuse	Lamina propria	Intra-épithéliale
J <sub>0</sub>	L	93481	04	00	00	00	01	00	00	01	00
		94242	00	01	00	00	00	00	00	00	01
		Moyenne ± Ecart type	2 ± 2,83	0.5 ± 0.71	0 ± 0	00 ± 00	0.5 ± 0.71	00 ± 00	00 ± 00	0.5 ± 0.71	0.5 ± 0.71
	BB	98060	00	00	00	01	03	00	00	00	01
		98021	02	01	00	00	00	00	00	00	00
		Moyenne ± Ecart type	1 ± 1.41	0.5 ± 0.71	0 ± 0	0.5 ± 0.71	1.5 ± 2.12	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	0.5 ± 0.71
J <sub>4</sub>	L	91181	00	01	00	00	12	00	00	01	00
		91381	01	00	02	00	01	00	17	19	05
		Moyenne ± Ecart type	0.5 ± 0.71	0.5 ± 0.71	0.5 ± 1.41	00 ± 00	6.5 ± 7.78	00 ± 00	8.5 ± 12.02	10 ± 12.73	2.5 ± 3.53
	BB	98111	14	20	04	97	82	08	01	02	02
		98013	01	03	00	00	00	00	02	02	01
		Moyenne ± Ecart type	7.5 ± 9.19	11.5 ± 12.02	2 ± 2.83	48.5 ± 68.59	41 ± 57.98	4 ± 5.66	1.5 ± 0.71	2 ± 00	1.5 ± 0.71
J <sub>8</sub>	L	92981	18	28	01	15	92	16	00	12	06
		93071	02	16	05	05	65	08	00	00	00
		Moyenne ± Ecart type	10 ± 11.31	22 ± 8.48	3 ± 2.83	10 ± 7.07	78.5 ± 19.09	12 ± 5.66	0 ± 0	6 ± 8.48	3 ± 4.24
	BB	98097	214	169	04	142	87	13	11	23	18
		98017	18	97	09	61	122	05	01	10	06
		98053	145	90	05	50	121	09	26	41	16
		98006	35	32	03	52	51	01	05	12	02
		Moyenne ± Ecart type	103 ± 92.98	97 ± 56.15	5.25 ± 2.63	76.25 ± 44.09	95.25 ± 33.69	7 ± 5.16	10.25 ± 10.96	21.5 ± 14.20	10.5 ± 7.42
J <sub>15</sub>		91071	42	34	15	43	39	00	08	18	20



	<b>L</b>	92441	14	27	13	18	82	04	126	208	143
		Moyenne $\pm$ Ecart type	28 $\pm$ 19.8	30.5 $\pm$ 4.95	14 $\pm$ 1.41	30.5 $\pm$ 17.68	60.5 $\pm$ 30.40	2 $\pm$ 2.83	67 $\pm$ 83.44	113 $\pm$ 134.35	81.5 $\pm$ 86.97
	<b>BB</b>	98075	48	66	10	26	33	01	126	117	79
		98010	102	86	26	191	117	01	175	103	75
		98005	89	24	15	102	77	01	78	67	20
		Moyenne $\pm$ Ecart type	79.66 $\pm$ 28.18	58.66 $\pm$ 31.64	17 $\pm$ 8.18	106.33 $\pm$ 82.58	75.66 $\pm$ 42.01	1 $\pm$ 0	126.33 $\pm$ 48.50	95.66 $\pm$ 25.79	58 $\pm$ 32.97
<b>J<sub>21</sub></b>	<b>L</b>	91441	01	20	01	00	01	00	07	09	14
		93482	49	73	06	70	52	09	34	31	15
		Moyenne $\pm$ Ecart type	25 $\pm$ 33.94	46.5 $\pm$ 37.48	3.5 $\pm$ 3.53	35 $\pm$ 49.5	26.5 $\pm$ 36.06	4.5 $\pm$ 6.36	20.5 $\pm$ 19.1	20 $\pm$ 15.56	14.5 $\pm$ 0.71
	<b>BB</b>	98102	154	85	03	123	73	10	320	46	51
		98064	98	111	03	77	44	04	138	73	32
		Moyenne $\pm$ Ecart type	126 $\pm$ 39.6	196 $\pm$ 18.38	3 $\pm$ 0	100 $\pm$ 32.53	58.5 $\pm$ 20.51	7 $\pm$ 4.24	229 $\pm$ 128.69	59.5 $\pm$ 19.1	41.5 $\pm$ 13.43
<b>J<sub>30</sub></b>	<b>L</b>	91611	50	36	03	13	01	01	04	06	03
		91182	01	02	00	04	02	00	18	01	01
		Moyenne $\pm$ Ecart type	25.5 $\pm$ 34.65	19 $\pm$ 24.04	1.5 $\pm$ 2.12	8.5 $\pm$ 6.36	1.5 $\pm$ 0.71	0.5 $\pm$ 0.71	11 $\pm$ 9.9	3.5 $\pm$ 3.53	2 $\pm$ 1.41
	<b>BB</b>	98089	110	58	07	21	16	00	32	47	04
		98009	129	62	03	138	07	01	66	14	08
		98012	81	29	02	31	11	00	96	15	09
		Moyenne $\pm$ Ecart type	106.66 $\pm$ 24.17	49.66 $\pm$ 18.01	4 $\pm$ 2.64	63.33 $\pm$ 64.86	11.33 $\pm$ 4.51	0.33 $\pm$ 0.58	64.66 $\pm$ 32.02	25.33 $\pm$ 18.77	7 $\pm$ 2.64

## Annexe XI

### Technique de Western blot adaptée

(*Haemonchus contortus*)

#### 1. Matériels et Réactifs

Observations		
<b>Matériel</b>	Pipettes Peigne Agitateur magnétique Plaques de verre, spacers Appareil à western blot générateur Scellage à chaud des sacs plastiques Bécher gradué Sacs plastiques Papier buvard Eponge Membrane de PVDF Balance	
<b>Antigène</b>		<b>Voir le protocole</b>
<b>Réactifs</b>	Acrylamide 40% H <sub>2</sub> O distillée Tampon d'échantillon Tampon Tris pH 8.8 Tampon Tris pH 6.8 Tampon d'électrophorèse Tampon de Transfert SDS APS 10% TEMED  Isobutanol  Marqueur de masses moléculaires PBS PBS Tween Méthanol Lait écrémé (Régilait <sup>ND</sup> )	

## 2. Méthodes

### 2.1. Préparation des échantillons (antigènes)

- Après l'autopsie, des échantillons de mucus abomasale (de quantité approximativement similaire) ont été prélevés à l'aide d'une lame de bistouri et met directement dans le PBS (4 ml) ;
- Centrifugation 12000 rpm pendant 30 mn ;
- Récupération de surnageant et conservation à -20 °C jusqu'à l'analyse.
- Si on veut utiliser l'échantillon directement, faire une dilution de 1 /2 avec le tampon de l'échantillon (Tri-Hcl, pH 6.8, Glycerol, SDS, Bromophenol Blue) et bouillir le tout à 90°C pendant 15 mn.

### 2.2. Préparation des gels

- Sortir tous les réactifs à Température ambiante ;
- Installation des plaques : . Poser la petite plaque sur la grande  
. Fixer l'ensemble sur le support

#### 2.2.1. Préparation du 1<sup>er</sup> gel (12 % d'Acrylamide) (gel de migration)

Dans un flacon 50, préparer comme suit, dans l'ordre :

Ordre	Solution	Rôle et mode d'emploi	Quantité	
			1 gel	.... gels
1	H <sub>2</sub> O distillée		2,175 ml	
2	Acrylamide 40%	Mailles du gel, Mélanger doucement	1,5 ml	
3	Tampon Tris pH 8.8	Garder le même pH	1,25 ml	
4	SDS	Recouvre la protéine de charge (-)	50 µl	
5	APS 10%	Initialise la polymérisation Attention polymérisation commence APS à ajouter avant TEMED	25 µl	
6	TEMED	Accélère la vitesse de polymérisation	2,5 µl	
Volume Total			5 ml	

- Couler doucement le gel entre les plaques en calant la pompette contre un bord ;
- Arrêter le niveau du gel au trait vu à travers les plaques ;
- Déposer 250 µl d'Isobutanol au-dessus du gel (pour éviter le contact avec l'air) ;
- Vérifier la stabilité avec le niveau à bulle ;
- Laisser reposer 1h à température ambiante (20 -25 °C).

#### 2.2.2. Préparation du 2<sup>ème</sup> gel (4 %) (gel de concentration)

- Vider l'Isobutanol et rincer 3 fois à l'eau distillée ;
- Essuyer avec un papier buvard sans toucher le gel ;

- Préparer le 2<sup>ème</sup> gel selon la composition et l'ordre suivants :

Ordre	Solution	Rôle et mode d'emploi	Quantité	
			1 gel	.... gels
1	H <sub>2</sub> O distillée		1,55 ml	
2	Acrylamide 40%	Mélanger doucement	0,25 ml	
3	Tampon Tris pH 6.8	Garder le même pH	0,63 ml	
4	SDS	Recouvre la protéine de charge (-)	25 µl	
5	APS 10%	Initialise la polymérisation Attention polymérisation commence APS à ajouter avant TEMED	12,5 µl	
6	TEMED	Accélère la vitesse de polymérisation	2,5 µl	
Volume Total			2,47 ml	

- Couler le second gel ;
- Poser le peigne immédiatement en commençant par une extrémité, les dents du peigne viennent à 1 avec le gel pour éviter les bulles ;
- Le haut du peigne, 1mm, doit être immergé dans le gel pour éviter contact avec air ;
- Laisser polymériser 30 minutes (maximum) ;
- Enlever le peigne – Laver 3 fois à l'eau distillée – Eponger avec papier absorbant ;
- Si on utilise le gel le lendemain, remplir de tampon Tris pH 6.8, et mettre au frigo, le tout recouvert de papier Alu.

### 2.3. Electrophorèse

- Sortir le gel du frigidaire ;
- Laver 3 fois à l'eau distillée ;
- Eponger avec un papier buvard ;
- Préparer le tampon d'électrophorèse (migration) 1X (100 ml du 10X dans 900 ml d'eau distillée).

#### 2.3.1. Dépôt des échantillons

- Le marqueur est déposé dans le premier puit à raison de 5µl ;
- Dépôt 20 µl d'antigène (l'échantillon préparé) dans chaque puit ;

#### 2.3.2. Migration de l'antigène

120 volts 2 h.

## 2.4. Electrotransfert

Traitement de la Membrane de PVDF (1 par gel):

- . Tremper 15 secondes dans du méthanol (une par une);
- . Rincer 1 à 2 minutes à l'ED ;
- . Tremper 5 minutes dans le tampon de transfert (200 ml de Méthanol, 100 ml Tampon 10X, 700 ml H<sub>2</sub>O distillée).

Faire tremper dans le tampon de transfert pendant 20 minutes les éléments suivants :

- Papier buvard (2 par gel) ;
- Eponge (2 par gel) ;

Réaliser l'empilement des différents éléments dans l'ordre suivant :

- Support noir posé sur la paillasse ;
- Eponge ;
- Papier buvard ;
- Gel de migration (enlever le gel de concentration):
  - . Séparer doucement les deux plaques, à l'aide d'un espaceur,
  - . Enlever le gel de concentration,
  - . Décoller doucement le gel de migration à l'aide d'une spatule en mettant de l'eau ou de Tampon de transfert,
- Membrane PVDF (éviter la formation de bulles d'air) ;
- Papier buvard ;
- Eponge ;
- Support transparent

Déposer les cassettes dans la cuve à transfert (coté noir de cassette vers coté noir du support) ;

Remplir le compartiment blanc de glaçons ;

Remplir la cuve de tampon de transfert ;

Brancher le générateur (250 mA pour deux gels);

Transfert 40 minutes ;

Arrêter le générateur en débranchant tous les circuits et récupérer le (s) membrane (s) :

- Laver 2 fois en PBS Tween 10 minutes ;
- Laver 2 fois en PBS seul 10 minutes.

Laisser le (s) membrane (s) séchée (s)

**NB (1) :** On peut, juste après le transfert, colorer la membrane avec un colorant spécifique des protéines, comme par exemple le bleu de Comassie. Cette opération va permettre de se rendre compte si l'électrophorèse et le transfert se sont bien passés.

**NB (2) :** Si on utilise le (s) membrane (s) le lendemain, conserver au congélateur dans un (des) sac (s) plastique (s) hermétiquement scellée (s) à chaud pour éviter que l'humidité du congélateur ne le (s) détériore.

## **2.5. Immunodétection**

Sortir le (s) membrane (s) du congélateur ;

Laver le (s) membrane (s) avec du PBS T + lait écrémé 5 % pendant 30 minutes ;

Retirer le PBS T + lait écrémé 5 % et déposer l'anticorps primaire (anti- GAL15) dilué avec PBS T et lait écrémé 5 % (1/50) pendant 90 minutes sur un agitateur à Température ambiante ;

Laver le (s) membrane (s) 3 fois, 5 minutes avec du PBS T;

Déposer le conjugué dilué dans le PBS Tween (1/50);

Incuber pendant 1 h à température ambiante sur un agitateur ;

Laver le (s) membrane (s) 4 fois 5 minutes dans le PBS Tween ;

Pendant les lavages, préparer le substrat : Révélateur (BIORAD ref : 8235)

- Préparer 1 Vol Opti-4CN diluent concentrate avec 9 Vol d'H<sub>2</sub>O distillée : Solution O
- Pour 10 ml de Solution O, additionner 0,2 ml d'Opti-4CN substrate et bien homogénéiser :  
la solution obtenu doit être opaque : Solution de révélation

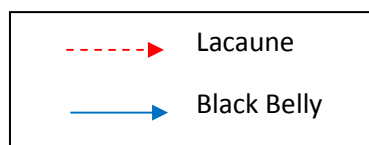
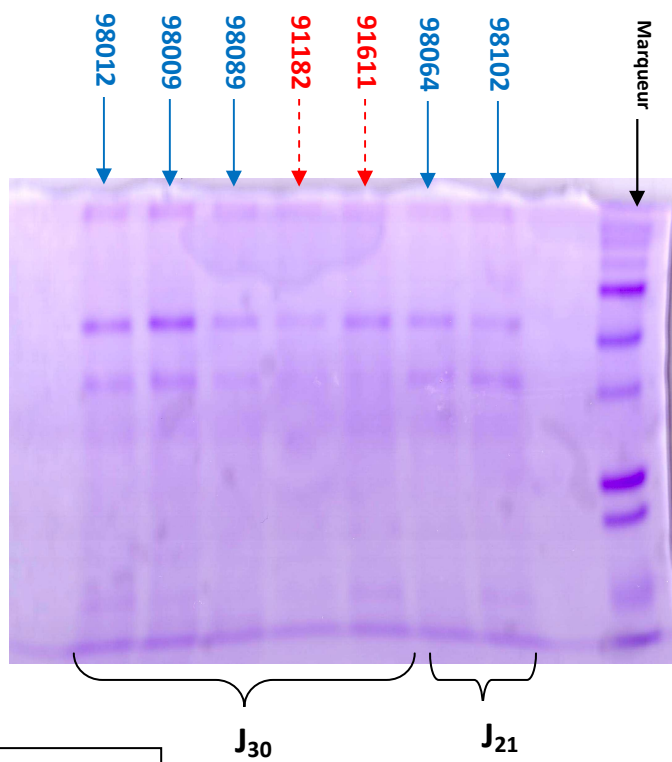
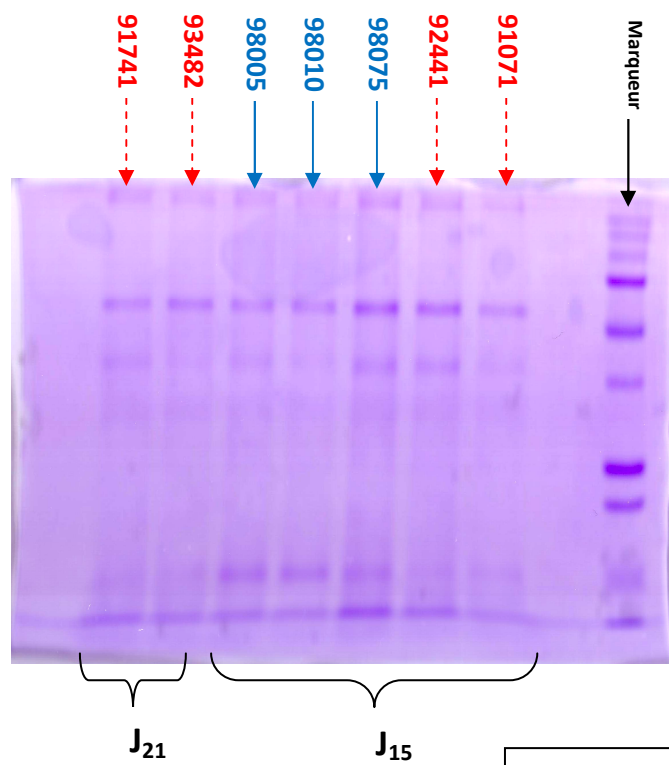
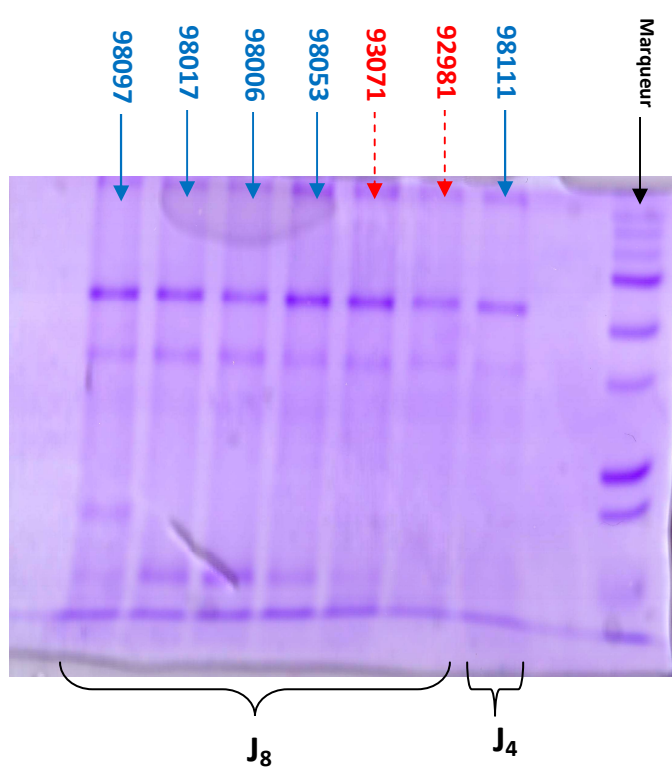
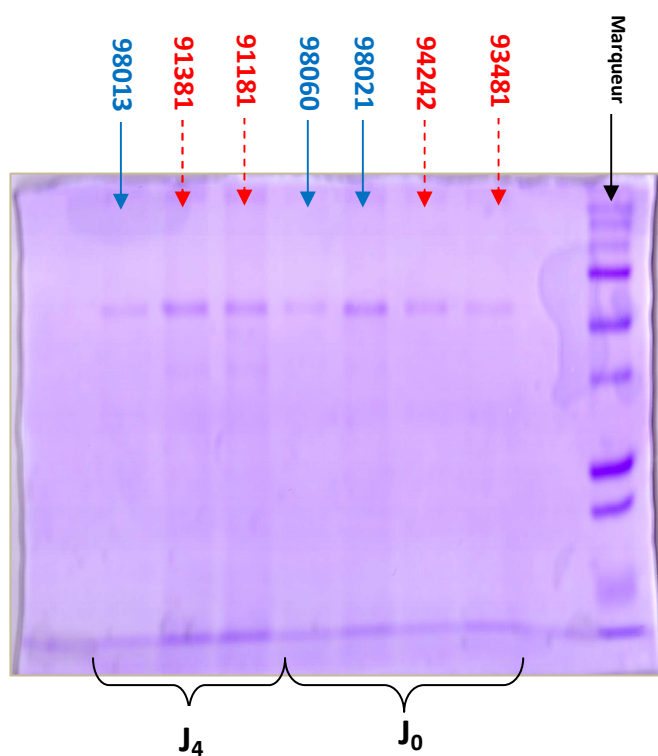
Retirer la (les) membrane (s) du PBS T et verser sur la (les) membrane (s), la solution de révélation ;

Laisser incuber 15 min sous agitation douce, jusqu'à l'apparition de la coloration de l'intensité désiré ;

Jeter la Solution de Révélation et rincer la membrane 15 min dans de l'eau

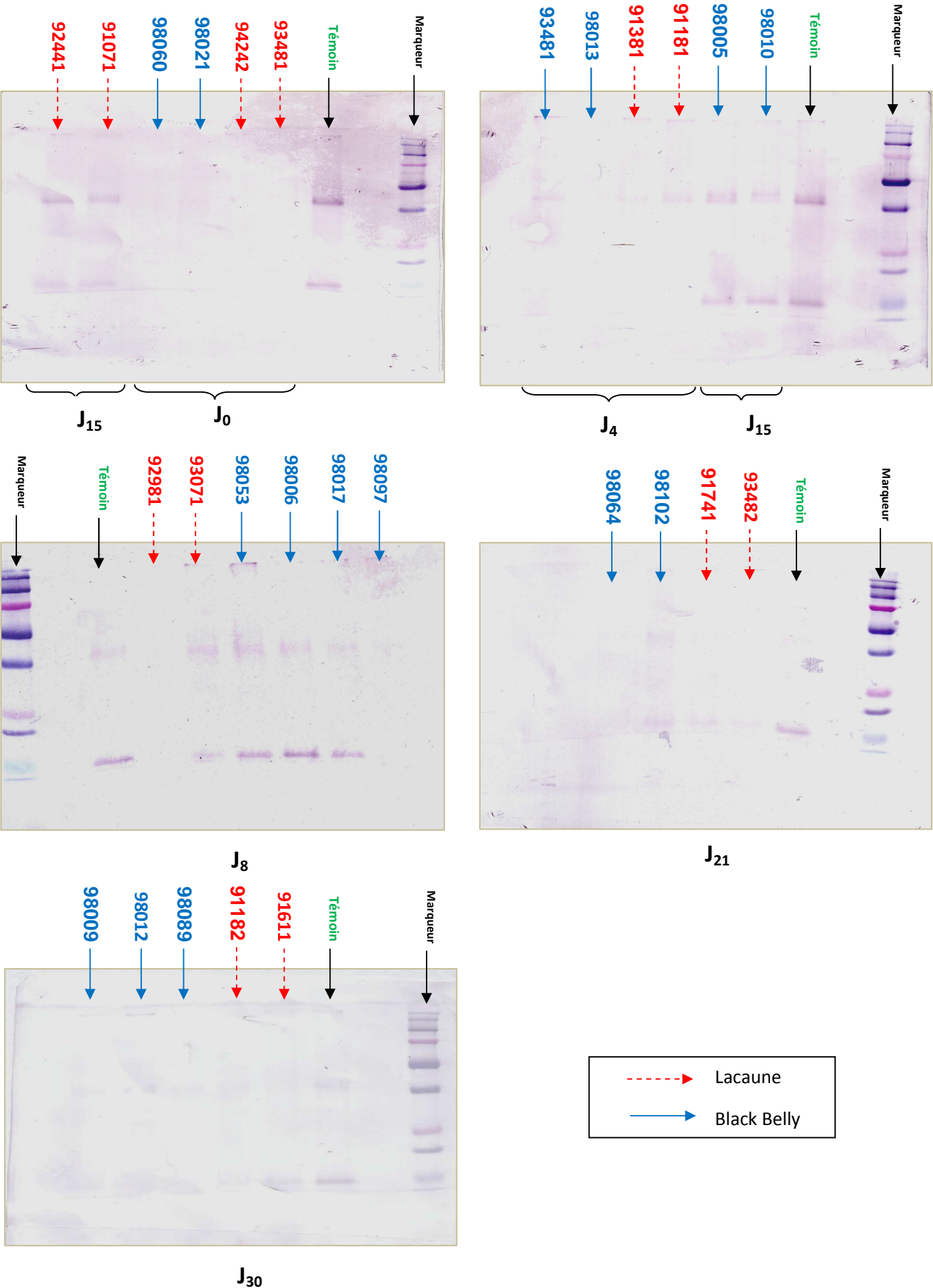
**Migration des protéines et Coloration  
par le bleu de Coomassie  
Révélation par Western Blot**

## Annexe XII : Bleu de Coomassie





Annexe XIII : Western Blot





**Nom :** BENGUESMIA

**Prénom :** Mohamed

**Titre du rapport :** Cinétiques des populations de parasites et des réponses de l'hôte au cours d'une primo-infestation par *Haemonchus Contortus* : Comparaison des races Lacaune et Martinik Black Belly

---

## Résumé

L'extension de la résistance des nématodes gastro-intestinaux aux anthelminthiques représente un réel problème et rend urgente la recherche de solutions alternatives comme la sélection d'animaux résistants. Toutefois, la méconnaissance des mécanismes de la réponse immunitaire des ovins contre ces strongles reste un obstacle à son développement. Nos études expérimentales avaient pour but d'évaluer la cinétique comparée de la présence de la protéine galectine 15 (ovGal-15) impliquée probablement dans la réponse immunitaire innée chez des animaux de race résistante (Martinik Black Belly) ou de race sensible (Lacaune) au cours d'une primo-infestation par *H. contortus*. De plus, les populations parasitaires et certains paramètres physiopathologiques ont été analysés chez ces animaux. Sur 28 agneaux primo-infestés (12 Lacaune et 16 Black Belly), on a démontré pour la première fois la présence de la protéine Gal-15 par la technique de Western Blot dans le mucus abomasal chez ces animaux avec une intensité plus importante chez les MBB que chez les Lacaune (à J<sub>8</sub> et à J<sub>15</sub>). La mesure des autres paramètres parasitologiques (intensité d'excrétion d'oeufs, charge parasitaire...) et physiopathologiques (éosinophilie sanguine et tissulaire, hématocrite...) a indiqué très clairement que les agneaux de race MBB sont plus résistants à *H. contortus* que les agneaux de race Lacaune.

## Mots clés :

Résistance ; Réponse immunitaire ; *Haemonchus contortus* ; Martinik Black Belly ; Lacaune ; Galectine 15, paramètres parasitologiques, physiopathologie.

---

## Abstract

The widespread of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes is a major issue and needs to be solved by alternative solutions such as selection of animals genetically resistant to the strongyles. However, mechanism of immune response in sheep remains badly understood against these worms. Our experimental aim is to compare the kinetics of the galectin 15 protein (ovGal-15) probably involved in the innate immune response of the resistant breed (Martinik Black Belly) and the susceptible breed (Lacaune) during the course of a primary infection by *H. contortus*. In addition, the parasite populations and some physiological parameters were analyzed. For the first time, we demonstrated the presence of the protein Gal-15 by the Western blot technique in the abomasal mucus in the 28 first-infected lambs (12 Lacaune and 16 Black Belly) with a greater intensity in MBB than in Lacaune (at D8 and D15). Other parasitological and pathophysiological parameters (intensity of excretion egg, worm burden, eosinophilia, hematocrit ...) clearly indicated that the MBB lambs are more resistant to *H. contortus* than Lacaune lambs..

## Keywords:

Resistance; Immune response; *Haemonchus contortus*; Martinik Black Belly; Lacaune; Galectin 15, parasitological parameters, physiopathology.

---